

**GUILHERME DE SOUZA ABRÃO**

**Caracterização de potenciais candidatos a biomarcadores relacionados ao  
déficit cognitivo de cães**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo  
2019

**GUILHERME DE SOUZA ABRÃO**

**Caracterização de potenciais candidatos a biomarcadores relacionados ao  
déficit cognitivo de cães**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Tânia Araújo Viel

Versão original

São Paulo  
2019

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica  
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

de Souza Abrão, Guilherme  
Caracterização de potenciais candidatos a  
biomarcadores relacionados ao déficit cognitivo de  
cães / Guilherme de Souza Abrão; orientadora Tania  
Araújo Viel. -- São Paulo, 2019.

50 p.

Dissertação (Mestrado) ) -- Universidade de São  
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Envelhecimento. 2. Adenosina. 3. Biomarcador.  
4. SDCC. I. Araújo Viel, Tania , orientador. II.  
Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Guilherme de Souza Abrão

Titulo da Dissertação/Tese: Caracterização de potenciais candidatos a biomarcadores relacionados ao déficit cognitivo de cães

Orientador: Tânia Araújo Viel

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a ...../...../....., considerou o(a) candidato(a):

(    ) **Aprovado(a)**            (    ) **Reprovado(a)**

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente:                              Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Caracterização de biomarcadores relacionados à memória em cães de jovens e velhos.", protocolada sob o CEUA nº 2888070118, sob a responsabilidade de **Tânia Araújo Viel** e equipe; *Guilherme de Souza AbrãEO; TãçNia Araãçjo Viel* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 31/08/2018.

We certify that the proposal "Characterization of memory-related biomarkers in young and old dogs.", utilizing 24 Dogs (12 males and 12 females), 24 Heterogenics rats (24 females), protocol number CEUA 2888070118, under the responsibility of **Tânia Araújo Viel** and team; *Guilherme de Souza AbrãEO; TãçNia Araãçjo Viel* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 08/31/2018.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: 24 meses

Depto/Setor: Farmacologia

Origem: Animais de proprietários

Espécie: Cães

sexo: Machos

Idade ou peso: 2 a 16 anos

Linhagem: Cães de médio porte

**N amostral:** 12

Origem: Animais de proprietários

Espécie: Cães

sexo: Fêmeas

Idade ou peso: 2 a 16 anos

Linhagem: Cães de médio porte

**N amostral:** 12

Origem: Animais provenientes de outros projetos

Espécie: Ratos heterogênicos

sexo: Fêmeas

Idade ou peso: 2 a 22 meses

Linhagem: Wistar

**N amostral:** 24

São Paulo, 13 de novembro de 2018



Prof. Dra. Luciane Valéria Sita

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



Dr. Alexandre Ceroni

Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

## **AGRADECIMENTOS**

Encerro mais um ciclo da minha carreira profissional e na bagagem levo muitos aprendizados e queridos colegas, que me ajudaram a percorrer o caminho do mestrado.

À minha orientadora Tânia, que nos anos de convivência, muito me ensinou, contribuindo para meu crescimento científico e intelectual.

Aos meus colegas do Grupo de Pesquisa em Neurofarmacologia e Envelhecimento, Mariana (Mãe), Natália, Arthur (Antônio), Helena (Malerba) e Júlia (Maria) agradeço por sempre dividirem a bancada da nossa “segunda casa” discutindo, sorrindo e aprendendo.

Ao departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, em nome do Prof. Hudson, que nos sustentou e deu suporte para a realização da maior parte desse trabalho. Agradeço também aos colegas do departamento Ricardo e Jaqueline, que sempre estavam unidos ao nosso grupo.

Aos meus pais Silvio e Raquel, e a minha avó Florinda, pelo auxílio financeiro e acima de tudo, o amor entregue por eles a mim.

À minha esposa Jéssica, pelo companheirismo, amparo, compaixão e paciência.

Ao Departamento de Farmacologia, pelo apoio para a realização desta pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

## RESUMO

ABRÃO, G. S. Caracterização de potenciais candidatos a biomarcadores relacionados ao déficit cognitivo em cães. 2020. 50 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Durante o processo de envelhecimento pode ocorrer redução de fatores que reforçam a memória, bem como o aumento de fatores que reduzem a manutenção dessa função cognitiva. A caracterização de biomarcadores que indicam o estado cognitivo no processo de envelhecimento é de grande relevância para o diagnóstico e/ou tratamento da disfunção cognitiva. O sistema adenosinérgico desempenha um papel essencial na manutenção da homeostase cerebral, principalmente através da ação inibitória e facilitatória dos receptores  $A_1$  e  $A_{2A}$ , respectivamente. Efeitos mediados por esses receptores controlam a transmissão sináptica basal, a neuroplasticidade cerebral (incluindo a densidade da neurotrofina BDNF) e os processos cognitivos, o que afeta diferentes comportamentos desde a locomoção até o humor. O objetivo do presente estudo foi investigar se os níveis de  $A_1$ ,  $A_{2A}$  e BDNF no sangue de ratos poderiam ser relacionados à memória e níveis dessas proteínas no cérebro, considerando-as, potencialmente, como biomarcadores periféricos da memória. A mesma relação foi avaliada em cães de companhia, considerando a idade, cognição e níveis sanguíneos dessas proteínas. Para isso, ratos Wistar fêmeas jovens ( $n=12$ , 3 meses de idade) e velhos ( $n=12$ , 24 meses de idade) foram submetidos ao teste de reconhecimento de objetos para análise das memórias de curta e longa duração. Em seguida, os animais foram anestesiados para extração do hipocampo e sangue. Os cães, de ambos os sexos, foram divididos em jovens ( $n=10$ , 1-2 anos) e velhos ( $n=12$ , acima de 10 anos) e o estado cognitivo foi avaliado usando um questionário aplicado aos proprietários (quanto maior a pontuação, pior a memória). O sangue (5 mL) foi coletado por venopunção jugular. A densidade das proteínas relacionadas à memória foi avaliada por western-blotting e ensaio de ELISA. Os dados foram expressos como medianas e intervalos interquartis e analisados pelo teste de Mann-Whitney. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . Os ratos velhos apresentaram perda significativa das memórias de curto e longo prazo, quando comparados aos animais jovens. No hipocampo, observou-se aumento significativo na densidade de receptores NMDA-R2B e AMPA2-3-4, pro-BDNF, e redução significativa na densidade de PSD-95, sinaptofisina, pCREB/CREB e CAMKIV nos velhos, comparado aos jovens, demonstrando a relação entre a redução da sinalização molecular da memória e a observação comportamental. Na análise de potenciais biomarcadores nos ratos, foi observada redução significativa de  $A_1$  e BDNF, e aumento significativo de  $A_{2A}$  tanto no hipocampo quanto no sangue de velhos, comparado aos jovens, sugerindo que essas proteínas poderiam ser utilizadas como biomarcadores do estado cognitivo dos animais. Em cães velhos, com redução expressiva das funções cognitivas, constatou-se redução significativa de  $A_1$  e BDNF, e aumento significativo de  $A_{2A}$ , quando comparado aos jovens, mostrando o mesmo padrão de distribuição em relação à idade, como observado em ratos. Com esse trabalho foi possível mostrar, pela primeira vez, que a alteração dos receptores de adenosina  $A_1$  e  $A_{2A}$  e BDNF no envelhecimento está relacionada à perda de memória em ratos e cães. Assim, essas proteínas poderiam ser potenciais biomarcadores do declínio cognitivo e alvos terapêuticos para cães com disfunção cognitiva.

**Palavras-chaves:** Envelhecimento. Adenosina. Biomarcador. SDCC.

## ABSTRACT

ABRÃO, G. S. Characterization of candidate potentials to biomarkers related to the cognitive deficit in dogs. 2020. 50 f. Dissertation (Msc, Master in Pharmacology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

During the aging process a decrease in factors that reinforce memory and an increase in others that reduce this cognitive function may occur. The characterization of biomarkers that indicate the cognitive status in the aging process is of great relevance for diagnosis and/or early treatment of memory loss. The adenosinergic system plays an important role in brain homeostasis, mainly through the inhibitory and facilitatory actions of  $A_1$  and  $A_{2A}$  receptors, respectively. Those receptors control basal synaptic transmission, neuroplasticity (including the density of the neurotrophin BDNF) and cognitive process, which affects different behaviors. The aim of this study was to verify if levels of  $A_1$ ,  $A_{2A}$  and BDNF in the blood of rats can be related to memory and levels of those proteins in the brain, considering them, potentially, as peripheral biomarkers of memory. The same relationship was investigated in companion dogs, considering age, cognition and blood levels of those proteins. For that, young ( $n=12$ , 3 months old) and old ( $n=12$ , 24 months old) female Wistar rats were submitted to the novel object recognition test to verify short and long-term memories. After that, they were anesthetized and the hippocampus and blood were extracted. Cognition of young ( $n=10$ , 1-2 years old) and old ( $n=12$ , over 10 years old) dogs, both sexes, was evaluated using a questionnaire applied to the dogs owners (the greater the score, the worst the cognition). The blood (5 mL) was collected from the jugular vein. Density of proteins related to memory formation was evaluated by western-blotting and ELISA. Data were expressed as medians and interquartile ranges and compared using Mann-Whitney test ( $p<0.05$ ). Differences were considered significant when  $p<0.05$ . Old rats presented loss in short and long-term memories, when compared to young. In hippocampus, it was observed a significant increase in the density of NMDA-R2B and AMPA2-3-4 receptors, pro-BDNF, and significant reduction of PSD-95, synaptophysin, pCREB/CREB and CAMKIV in the old animals, when compared to the young, showing the relationship between the reduction of memory signaling and behavior. In the analysis of the potential biomarkers in rats, it was observed a significant reduction in  $A_1$  and BDNF as long as an increase in  $A_{2A}$  both in the hippocampus and brain of old animals, when compared to the young, suggesting that those proteins could be taken as biomarkers for the cognitive state. In old dogs, with expressive reduction in cognitive functions, there was a significant decrease in  $A_1$  and BDNF densities and increase in  $A_{2A}$ , when compared to the young, showing a similar pattern of distribution related to the age, as observed in rats. This work showed, for the first time, that alteration of  $A_1$  and  $A_{2A}$  receptors and the neurotrophin BDNF in the elderly is related to memory loss in both rats and dogs. In this way, those proteins could be considered potentially as biomarkers for the cognitive decline and maybe therapeutic targets for dogs with cognitive dysfunction.

**Keywords:** Ageing. Adenosine. Biomarker. CCD.



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
1.1	<i>Longevidade em cães .....</i>	<i>11</i>
1.2	<i>Bases biológicas de formação da memória.....</i>	<i>13</i>
1.3	<i>Síndrome da disfunção cognitiva canina.....</i>	<i>14</i>
1.3.1	Características comportamentais da SDCC .....	15
1.4	Possíveis biomarcadores para a manutenção ou perda da memória.....	16
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
3.1	<i>Animais.....</i>	<i>20</i>
3.2	<i>Análise comportamental dos ratos .....</i>	<i>20</i>
3.2.1	Teste de reconhecimento de objeto .....	20
3.3	<i>Análise comportamental dos cães.....</i>	<i>22</i>
3.4	Coleta de sangue total para obtenção do plasma rico em plaquetas de cães e ratos e extração de proteínas de hipocampo de ratos .....	22
3.5	<i>Análises bioquímicas e moleculares.....</i>	<i>23</i>
3.5.1	Avaliação de parâmetros biológicos relacionados à cognição .....	23
3.6	<i>Análise estatística.....</i>	<i>25</i>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>26</b>
4.1	<i>Avaliação da memória de curta e longa duração de ratos através do teste de reconhecimento de objeto .....</i>	<i>26</i>
4.2	Comparação dos níveis de proteínas relacionadas à formação da memória no hipocampo de ratos jovens e velhos .....	28
4.3	Avaliações da densidade dos receptores de adenosina A <sub>1</sub> e A <sub>2A</sub> no hipocampo de ratos.....	29
4.4	Avaliações da densidade dos receptores de Adensoina A <sub>1</sub> e A <sub>2A</sub> no sangue de ratos .....	30
4.5	Determinações de BDNF total em hipocampo e sangue de ratos.....	31
4.6	Análise de correlação entre a idade e os níveis central e periférico das densidades de receptores de Adenosina A <sub>1</sub> /A <sub>2A</sub> e BDNF de ratos.....	31
4.7	Avaliação do estado cognitivo dos cães.....	32

4.8	Avaliações das densidades dos receptores de Adenosina A <sub>1</sub> e A <sub>2A</sub> em sangue de cães .....	33
4.9	<i>Determinação</i> de BDNF total em sangue de cães .....	34
4.10	Análise de correlação de A <sub>1</sub> , A <sub>2A</sub> e BDNF periféricos de cães e ratos: relação entre a densidade das proteínas e a idade.....	35
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>36</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>41</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>42</b>
	<b>Apêndices</b> .....	<b>49</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente é observado um aumento significativo da expectativa de vida de seres humanos e animais. Esse é claramente um processo ligado à globalização, pois demonstra os avanços em tecnologia, cuidados de saúde e nutrição ao longo do último século, elevando a proporção de humanos e animais idosos na população mundial.

O envelhecimento biológico é composto de um processo de desenvolvimento seguido de comprometimento gradual progressivo da função normal dos tecidos, resultante de muitos eventos moleculares que causam acúmulo de componentes celulares danificados no organismo, incluindo proteínas e DNAs (Head, 2013). Tais eventos moleculares têm sido relacionados tanto ao estresse quanto ao desenvolvimento de demências como à Doença de Alzheimer (DA). Nesse sentido, o estudo das alterações moleculares ao longo do envelhecimento tem sido considerado, de forma extensiva, como importante estratégia para buscar a elucidação dos mecanismos neurobiológicos de doenças comuns à velhice, pois as alterações moleculares apresentam intensa relação com o declínio neurocognitivo nessa fase da vida.

Desse modo, como o aumento da longevidade é acompanhado pela elevação da probabilidade do surgimento de transtornos que causam demências, sobretudo a DA, há uma maior necessidade de investigar candidatos a biomarcadores do comprometimento neurocognitivo, objetivando o diagnóstico precoce e/ou novos alvos terapêuticos.

### **1.1 Longevidade em cães**

Atualmente, com os avanços em tecnologia, cuidados de saúde e nutrição, é observado um aumento significativo da expectativa de vida de seres humanos e animais. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a proporção de pessoas com mais de 60 anos está aumentando e espera-se atingir 22% da população mundial em 2050. Embora não haja relatos dessa projeção na Medicina Veterinária, observa-se elevada semelhança com cães e gatos na rotina clínica veterinária, tornando doenças ligadas ao envelhecimento mais evidentes.

A longevidade e a mortalidade do cão doméstico (*Canis lupus familiaris*) estão ligadas à morfologia corporal, o que é extremamente variável, pois a espécie exibe uma imensa diversidade morfológica, variando de 1 kg para o Chihuahua a 85 kg para o Mastiff. Diante desta perspectiva, achados revelam que o tamanho do corpo

dos cães é inversamente proporcional à longevidade, indicando que os cães de pequeno porte apresentam maior longevidade em relação aos cães de médio e grande porte (Patronek et al., 1997). Devido a isso, a estimativa da longevidade canina varia entre 6 e 16 anos, dependendo da população analisada. Por exemplo, a média estimada para o Border collie é de 13 anos contrastando com a do Dogue Alemão, que é de 6,5 a 8,5 anos (O'Neill et al., 2013). As razões para essas diferenças são bastante variadas.

Estudos sugerem que existem relações com os efeitos do estresse oxidativo ao longo da vida, pois em cérebros de cães velhos de grande porte a geração de grupos carbonilas aumenta de acordo com a idade, sendo associada com baixas atividades endógenas da glutamina sintetase e superóxido dismutase, aumentando o dano oxidativo ao DNA ou ao RNA, o que pode reduzir a longevidade desses animais (Head, 2013). Além disso, uma abordagem genômica envolvendo o telômero (extremidade livre dos cromossomos formada por sequências repetidas de DNA, cuja função é garantir que cada ciclo de replicação seja completado) mostrou que o encurtamento dessas estruturas nos cães é fortemente consistente com a raça e extensão da longevidade, pois o estresse oxidativo e a incapacidade da DNA polimerase de replicar as extremidades das moléculas do DNA desempenham papéis importantes na perda de telômeros em diferentes espécies (Epel et al., 2004). Quando suficientemente curtos, como visto no Dogue Alemão, com cerca de 11 pares de base e que apresenta longevidade média de 6,9 anos, os telômeros iniciam uma resposta ao estresse resultando em um rápido envelhecimento celular (Fick et al., 2012; van Deursen, 2014). Nesse mesmo estudo, foi observado que a taxa média da perda de telômero com a idade (360 pares de base/ano) nos cães é muito maior do que a observada em humanos (20-40 pares de base/ano), esclarecendo a diferença da longevidade entre as espécies (Fick et al., 2012) e indicando a relevância de estudar animais do mesmo porte.

A rapidez com que os cães envelhecem, em relação aos seres humanos, é um fator vantajoso quando se trata de investigar os mecanismos biológicos do envelhecimento, já que as mudanças relacionadas à idade podem ser avaliadas em um período de tempo muito mais curto (Gilmore; Geer, 2015). Embora não seja uma equivalência perfeita, usando modelos lineares é estimado que cinco anos e meio a sete anos em seres humanos equivale aproximadamente a um ano de vida de um Beagle. Além disso, para serem considerados velhos, os cães devem possuir mais

de nove anos de idade, que representam humanos entre 66-96 anos. Usando esses mesmos modelos, outros autores consideram cães com idade média entre cinco a nove anos (aproximadamente entre 40-60 anos em seres humanos) e jovens abaixo de cinco anos (inferior a 40 anos em humanos) (Patronek, et al., 1997). Dessa maneira, estudos comparáveis do envelhecimento de cães podem ser realizados de sete a dez vezes mais rapidamente do que em seres humanos, propiciando um estudo translacional entre as espécies relativamente rápido, valioso e compatível.

### ***1.2 Bases biológicas de formação da memória***

As bases biológicas da formação da memória envolvem, inicialmente, a percepção sensorial (visual, olfatória, gustativa, auditiva e somestésica). A entrada e codificação de informações advindas do ambiente passam por vias neuronais paralelas no sistema nervoso central e são comparadas com os arquivos de memórias ou de informações pré-existentes. Lesões nas áreas associativas do córtex levam a distúrbios de percepção, ou seja, ao não reconhecimento de objetos, sons, o próprio corpo e o ambiente externo (Lent, 2010). De acordo com o estímulo sensorial, células específicas são despolarizadas gerando um fenômeno que pode ser reproduzido experimentalmente utilizando-se estimulações elétricas do tipo teta (disparos elétricos a 100 Hz, separados por intervalos de 200 ms). Trata-se de uma alteração eletrofisiológica conhecida como potenciação de longa duração (do inglês, "long-term potentiation", LTP). Essas despolarizações, denominadas potenciais de ação, são transmitidas ao longo de todo o axônio de neurônios glutamatérgicos até atingirem o terminal axônico. Nesse ponto, ocorre a liberação do neurotransmissor glutamato e a sinapse química se estabelece. A estimulação de receptores de glutamato AMPA e NMDA leva à entrada de íons cálcio no terminal pós-sináptico determinando uma cascata de reações que culmina com a formação e liberação de neurotrofinas como o BDNF ("brain-derived neurotrophic factor), NGF (nerve growth factor) e IGF (insulin-like growth factor). Essas estimulações conectam proteínas do citoesqueleto como o sistema integrinas-actina nos dendritos pós-sinápticos e as alterações nesse sistema modificam a densidade de espículas dendríticas (Hotulainen; Hoogenraad, 2010). Dessa forma, o contato entre axônio e dendrito é aumentado e leva a alterações morfológicas e/ou de neurotransmissão em sinapses. Esse fenômeno é denominado neuroplasticidade e fortalece as conexões neuronais, aumentando a associação entre neurônios (Casey et al., 2002). A LTP ocorre no hipocampo e em outras

áreas cerebrais, onde as alterações sinápticas são mantidas por um longo período de tempo após transcrição gênica e síntese de novas proteínas, resultando em aumento da eficácia da transmissão sináptica (Kandel, 2001; Izquierdo et al., 2008, Mayford et al., 2012). Desde a época em que foi proposto até os dias de hoje, esse processo é o que mais se adequa e que é mais aceito para demonstrar o que chamamos de memória de longa duração.

Durante o processo de envelhecimento, pode ocorrer redução de fatores que reforçam a memória, bem como o aumento de fatores que reduzem a manutenção das funções cognitivas, o que torna desejável a caracterização de um biomarcador que indique o status da cognição no processo de envelhecimento, objetivando o diagnóstico e/ou tratamento precoce do declínio cognitivo.

### ***1.3 Síndrome da disfunção cognitiva canina***

As alterações do comportamento canino que respondem a alterações fisiopatológicas relacionadas à idade e que envolvem diferentes condutas e alterações cognitivas estão incluídas sob a denominação de Síndrome da Disfunção Cognitiva Canina (SDCC), que também é chamado de Alzheimer Canino, por considerar as similaridades do comportamento cerebral e histopatológico com a DA em seres humanos (Head, 2013; Kaeberlein et al., 2016; Youssef et al., 2016; Mazzatenta et al., 2017).

Há diversos fatores neuropatológicos do envelhecimento cerebral de cães que são semelhantes aos observados em seres humanos acometidos por DA (Youssef et al., 2016; Mazzatenta et al., 2017). Entre os principais achados macroscópicos de ambas as espécies, podem ser encontradas a atrofia generalizada da região cortical, a retração dos giros cerebrais com espessamento dos sulcos e o aumento do volume dos ventrículos, que estão intimamente relacionados com a perda de massa encefálica neuronal. Nos achados histopatológicos, estão presentes os danos ao DNA, calcificação das meninges, alterações vasculares, neuronais e gliais, acúmulo de lipofuscina e edema axonal. Além disso, ocorre deposição de quantidades significantes de peptídeo  $\beta$ A no hipocampo, córtex pré-frontal, entorrinal, occipital e no cerebelo, levando ao desenvolvimento de placas difusas que se correlacionam fortemente com alterações comportamentais, como discriminação de objetos, aprendizagem reversa e aprendizagem espacial. Apesar de não haver relatos consistentes da presença de emaranhados neurofibrilares em cães, a presença da proteína Tau hiper-

fosforilada é relatada em cérebros de cães e gatos idosos, que pode representar um estágio prévio ao envelhecimento neurofibrilar (Borràs et al., 1999; Brione, 2010).

Em seres humanos acometidos por DA e possivelmente em cães que apresentam um quadro de neurodegeneração, causados principalmente pela deposição de  $\beta$ A, são acarretados à degeneração neuronal e disfunção sináptica, a diminuição da função neuronal, dos canais de cálcio, dos potenciais sinápticos e depleção dos neurotransmissores, o que reflete em deficiência de memória e alterações secundárias, como déficit de atenção e/ou codificação de novas informações (Araujo et al., 2007; Araujo et al., 2011).

### **1.3.1 Características comportamentais da SDCC**

Para descrever os sintomas da síndrome, foi caracterizada a sigla em inglês “**DISHA**” “*Desorientation*”, “*altered Interactions with owners/other pets/environment*”, “*Sleep-wake cycle disturbances*”, “*House-soiling*”, “*changes in Activity*” (Landsberg; Araujo, 2005), onde os sinais de desorientação do cão são caracterizados quando o animal se perde em ambiente familiar, olha fixamente para um local, fica preso em lugares sem conseguir sair e anda de forma compulsiva. As alterações da interação se manifestam pela diminuição do contato com os membros da família e o não reconhecimento destes. Alterações do ciclo de sono-vigília são aparentes em cães que passam a dormir durante o dia e ficam mais agitados durante a noite, podendo chorar, vocalizar e arranhar o chão. A perda do treinamento higiênico inclui micção e defecação em locais inapropriados, mesmo na presença dos proprietários, sem causas médicas que justifiquem tal comportamento (Landsberg et al., 2012). Além disso, sinais de medo e ansiedade, que são comumente relatados por proprietários de cães idosos, podem ser semelhantes à agitação e ansiedade encontrado em seres humanos com DA, sendo considerado um componente da SDCC (Landsberg; Araujo, 2005). Por fim, os déficits de memória, que são os primeiros sinais reconhecidos de declínio cognitivo em seres humanos, foram identificados no início do processo de envelhecimento cerebral em cães, caracterizando-os como sinais da SDCC (Landsberg et al., 2012).

#### **1.4 Possíveis biomarcadores para manutenção ou perda de memória**

O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, do inglês *brain-derived neurotrophic factor*) é membro da família das neurotrofinas, peptídeos encontrados no sistema nervoso central e periférico. É codificado pelo gene (*bdnf*) e a organização complexa do seu gene é bem conservada entre as espécies, desde peixes a mamíferos (Heinrich; Pagtakhan, 2004; Aid et al., 2007), sugerindo que o controle da sua expressão têm uma forte e importante significância funcional (Cohen-Cory et al., 2010). O BDNF é sintetizado no retículo endoplasmático como proteína precursora (pró-BDNF) com peso molecular de 32-35 kDa, movendo-se no interior da célula via vesícula para o complexo trans-Golgi, que apresenta extrema importância para modificações pós-transducionais. Na presença do “raft” lipídico associado com a carboxipeptidase E, o pró-BDNF é transportado para a membrana de dendritos pós-sinápticos, dependendo da atividade do neurônio. Em seguida, o domínio terminal do pró-BDNF é clivado por enzimas denominadas convertases (PC1-7 e furin), convertendo-o na forma biologicamente ativa, o BDNF maduro (13 kDa). Desse modo, o BDNF maduro age em seu receptor específico TrKB (receptor de tirosina kinase B) exercendo as suas principais funções, como o crescimento e diferenciação de novos neurônios, maturação e refinamento da arborização dendrítica e plasticidade sináptica (Cohen-Cory et al., 2010; Beeri; Sonnen, 2016). Entretanto, o pró-BDNF pode não sofrer clivagem e ser liberado no meio extracelular na presença de metaloproteínas (Lebmann; Brigadski, 2009), podendo ativar seletivamente o receptor de neurotrofina p75, induzindo a via de sinalização pró-apoptótica (Teng, 2005). Além disso, há relatos indicando que a quantidade de BDNF no cérebro de seres humanos é proporcional à proteção ao declínio cognitivo, ou seja, indivíduos que apresentaram níveis maiores de BDNF no cérebro exibiram declínio cognitivo mais lento, quando comparados aos seres humanos com níveis menores, ao longo de sete anos (Buchman et al., 2016). No sistema periférico, o BDNF é produzido e estocado nas plaquetas, onde esse sistema pode representar um marcador de seus níveis em longo prazo, pois as plaquetas circulam no sangue periférico durante 10 dias, tornando-a relevante para o monitoramento dos níveis de BDNF no SNC (Lommatzsch et al., 2005; Pláteníket al., 2014; Lebois; Josefsson, 2016). Alguns trabalhos sugerem que a presença da neurotrofina no sangue poderia ser indicativa do estado cognitivo (Beeri; Sonnen, 2016; Buchman et al., 2016). Dessa forma, a investigação dos níveis



no sangue seria de grande valia, visto que a sua quantidade está intimamente relacionado ao estado cognitivo.

Outro sistema que vem sendo relacionado ao estado cognitivo é o purinérgico. A adenosina é o produto da conversão de adenosina monofosfato (AMP) pela ecto-5'-nucleotidase ou CD75 e atua como agonista em receptores acoplados à proteína G (GPCRs). O seu principal papel é atuar como modular citoprotetor em condições fisiológicas e patofisiológicas (Jacobson; Gao, 2006). Como característica geral dos GPCRs, os receptores de adenosina são compostos por sete hélices transmembranares com a região amino-terminal (N-terminal) localizada no meio extracelular e a carboxi-terminal (C-terminal), na região citosólica. São classificados em quatro subtipos de receptores, conhecidos como  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  e  $A_3$ . Em geral, após a interação entre agonista e receptor, há uma mudança conformacional da proteína G, induzindo a troca de uma molécula de GDP (difosfato de guanosina) por GTP (trifosfato de guanosina) no sítio catalítico localizado na subunidade alfa da proteína G. O complexo GTP-alfa se dissocia das subunidades beta e gama, transmitindo o sinal celular para uma variedade de efetores intracelulares de ativação ou inibição de enzimas e, nesse caso, definida principalmente pela adenilato ciclase. Os receptores  $A_1$  e  $A_3$  inibem a produção do AMP cíclico através do acoplamento à proteína  $G_i$ ; os receptores  $A_{2A}$  e  $A_{2B}$  são acoplados à proteína  $G_s$  ou  $G_o$ , respectivamente, por estimularem a adenilato ciclase, tendo como produto final a formação do AMP cíclico (Canas et al., 2018).

O sistema adenosinérgico apresenta um papel essencial na manutenção da homeostasia cerebral, sobretudo, através da ação inibitória e facilitatória dos receptores  $A_1$  e  $A_{2A}$ , respectivamente (Pagnussat et al., 2015). Os efeitos paralelos e combinados mediados por tais receptores controlam a transmissão sináptica basal e a neuroplasticidade cerebral, contribuindo para a codificação da informação em circuitos neuronais, o que afeta diferentes comportamentos, desde a locomoção até o humor (Chen et al., 2013). Em particular, foi reconhecida a participação dos receptores de adenosina em processos cognitivos, como demonstrados com o uso da cafeína, um antagonista não seletivo dos receptores de adenosina, que controlam a execução da memória (Cunha; Agostinho, 2010). Desse modo, demonstrou-se que a administração aguda de cafeína melhora o reconhecimento de objetos (Botton et al., 2010), o desempenho na esQUIVA inibitória em roedores (Angelucci et al., 1999) e na discriminação de tarefas em seres humanos (Borota et al., 2014). Além disso, ob-

servou-se que o consumo crônico de cafeína reduziu não só a disfunção cognitiva observada durante o envelhecimento e na DA em seres humanos (Eskelinen et al., 2009; Cao et al., 2012), como também em modelos animais (Espinosa et al., 2013; Laurent et al., 2014). Em concordância com esses estudos, foi ainda verificado um aumento de receptores  $A_{2A}$  em neurônios glutamatérgicos de camundongos velhos e uma melhora da memória com o uso de antagonistas de  $A_{2A}$  nesses animais (Costenla et al., 2011).

Outros estudos mostram que o aumento da expressão desses receptores em animais está associado à neurodegeneração e déficit de memória e que o uso de antagonistas preveniu o déficit de memória induzido por escopolamina (Pagnussat et al., 2015). Uma implicação funcional do receptor  $A_{2A}$  foi ainda observada na translocação de receptores TrkB de BDNF através da "rafts" lipídicos, influenciando a liberação de glutamato e a plasticidade sináptica hipocampal (Assaife-Lopes et al., 2014). Portanto, acredita-se que os receptores de adenosina  $A_1$  e  $A_{2A}$ , ainda pouco estudado em cães, sejam coadjuvantes na fisiopatologia do declínio cognitivo no envelhecimento, tornando-os substancialmente um futuro alvo de diagnóstico e/ou terapêutica relevante.

Diante disso, pretendemos investigar a densidade dos receptores de adenosina  $A_1$  e  $A_{2A}$ , e da neurotrofina BDNF e propor que possam ser considerados como biomarcadores da memória, usando como modelo os cães de companhia, pois além de compartilharem o mesmo ambiente e estilo de vida, sendo expostos a semelhantes fatores que influenciam no envelhecimento, apresentam diversas semelhanças neuropatológicas com os seres humanos, como a disfunção cognitiva. Assim, o projeto tem como escopo criar subsídios, como pesquisa básica, na caracterização de possíveis biomarcadores periféricos relacionados à consolidação e fortalecimento da memória para o futuro desenvolvimento de novos métodos diagnósticos e terapêuticos objetivando o reconhecimento precoce do declínio cognitivo de ambas as espécies.

## 2 OBJETIVOS

### **Geral**

Avaliar a memória e realizar análise comparativa translacional entre os níveis de proteínas relacionadas à formação e manutenção da memória em animais jovens e velhos

### **Específicos**

1. Comparar o estado cognitivo de ratos jovens e velhos e de cães jovens e velhos
2. Avaliar a densidade de receptores de Adenosina ( $A_1/A_{2A}$ ) e da neurotrofina BDNF no hipocampo de ratos jovens e velhos e comparar à densidade sanguínea desses receptores.
3. Realizar análise comparativa dos níveis proteicos no hipocampo e sangue com o estado cognitivo dos animais.
4. Avaliar a densidade dos receptores  $A_1$  e  $A_{2A}$ , e de BDNF no sangue de cães de médio porte jovens e velhos.
5. Realizar análise comparativa dos níveis proteicos sanguíneos com o estado cognitivo apresentado pelos cães.
6. Realizar a análise translacional dos achados nas duas espécies.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Os ratos (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar, albinos, fêmeas, com 4 (n = 12, grupo jovem) e 24 (n = 12, grupo velho) meses de idade foram fornecidos pelo biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, onde foram mantidos durante o processo de envelhecimento.

Os cães (*Canis lupus familiaris*) foram recrutados por meio eletrônico, através de divulgação do projeto em redes sociais. Em seguida, os cães de ambos os sexos, hípidos, de raças de médio porte, com idade média de 1,5 (n = 10, grupo jovem) e acima de 10 (n = 12, grupo velho) anos, foram selecionados de proprietários voluntários, moradores do estado de São Paulo (Apêndice, Tabela 1). Foram excluídos, de acordo com o histórico e avaliação física, animais que apresentaram doenças crônicas neuromusculares.

Todos os procedimentos experimentais e manuseio geral dos animais foram realizados de acordo com o “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (National Institute of Health). Além disso, essa pesquisa foi autorizada pelo Comitê de Ética em Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA – ICB/USP, protocolo nº 2888070118) e os procedimentos em cães foram aplicados após o consentimento por escrito dos proprietários.

#### 3.2 Análise comportamental dos ratos

##### 3.2.1 Teste de Reconhecimento de Objeto

A avaliação da memória foi realizada pelo teste do Reconhecimento de Objeto (RO), que se baseia na capacidade de discriminar entre objetos a que os animais tenham sido previamente expostos e objetos novos. Roedores possuem uma tendência natural de explorar mais tempo novos objetos do que aqueles já conhecidos. Portanto, é possível utilizar essa preferência como um índice de memória relacionada à função hipocampal (Antunes; Biala 2012). Dessa forma, a redução no índice de RO tem sido descrito como um método simples para a investigação de déficits de memória (Goulart et al., 2010; Vogel-Ciernia; Wood, 2014). O teste é realizado em uma caixa plástica quadrada, com dimensões de 41 x 34 x 16 cm e consiste em três fases: habituação, treino e teste. Na fase de habituação, o animal é colocado no

campo aberto para que haja o reconhecimento do ambiente a explorar; na fase de treino, é adicionado um objeto (A) no campo aberto, e o animal explorará durante 10 minutos. Logo em seguida, o animal é retornado para a sua respectiva gaiola de convívio, após 90 minutos (memória de curta duração) e 24 horas (memória de longa duração) é realizada a fase de teste, onde o mesmo é colocado novamente no campo aberto com dois objetos, familiar e novo (A+B), durante 5 minutos. Após cada fase, os objetos são variados de forma aleatória e o campo e os objetos são limpos com solução de etanol a 5% para evitar que o comportamento dos animais seja guiado pelo odor. As sessões foram registradas com uma videocâmera JVC Everio e analisadas no software SMART ® (Polyvalent Video-Tracking System da Panlab Harvard Apparatus, Espanha) por um observador previamente treinado. A locomoção foi registrada automaticamente pelo programa, com base na distância total percorrida. Foi registrado também, o tempo de exploração de cada objeto que consiste no tempo em que o animal permanece em contato físico com o objeto utilizando as patas dianteiras e traseiras, focinho, boca ou língua, assim como os episódios de *headcock* (movimentos da cabeça de um lado ao outro olhando para o objeto), olhar direto (orientação rápida da cabeça e olhos direcionados ao objeto) e monitoramento visual (movimentos lentos de varredura da cabeça direcionados ao objeto) (Antunes; Biala, 2012). Para a sessão de teste, foi calculado:

1. Índice de Discriminação (ID), que permite a discriminação entre o objeto novo e familiar, usando a seguinte fórmula (Ennaceur; Delacour, 1988):

[ID = (tempo de exploração do objeto novo – tempo de exploração do objeto familiar) / (tempo de exploração dos dois objetos)]. O resultado pode variar entre +1, 0 e -1. O índice 0 indica que o animal explorou igualmente os dois objetos (ao acaso), enquanto que o índice +1 demonstra que o animal explorou por mais tempo o objeto novo do que o familiar; -1 demonstra o inverso.

2. Índice de Preferência (IP), que indica a proporção da quantidade do tempo gasto explorado em qualquer um dos objetos na fase teste (Ennaceur; Delacour, 1988):

[IP = tempo de exploração do objeto novo / (tempo de exploração do objeto novo + tempo de exploração do objeto familiar) x 100]. Assim, o IP acima de 50% indica preferência para o objeto novo, abaixo de 50% preferência para o objeto familiar e 50% preferência nula.

A ocorrência de uma memória de reconhecimento será definida como uma maior exploração e maior preferência pelo objeto novo durante a sessão teste, uma vez que roedores em cativeiro exploram mais objetos novos em seu ambiente (Antunes; Biala, 2012).

### **3.3 Análise comportamental dos cães**

#### **3.3.1 Exame de estado comportamental**

O exame de estado comportamental é um breve questionário com o objetivo de rastrear perdas das funções cognitivas. A aplicação do questionário foi realizada aos proprietários com perguntas específicas envolvendo o comportamento dos cães, onde foi atribuído pontos de acordo com o domínio cognitivo investigado, conforme pode ser observado no Apêndice B. O exame de estado comportamental por meio desse questionário é uma ferramenta de fácil acesso e aplicação, tornando-o de extrema valia para a prática clínica (Rofina et al., 2003;2006).

No teste, a partir da pontuação cognitiva, os cães podem ser classificados em:

- Domínios cognitivos intactos: até 10 pontos (*non - Canine cognitive dysfunction; n-CCD*).
- Limítrofes para a SDCC: entre 11 e 15 (*borderline - Canine cognitive dysfunction; b-CCD*).
- Disfunção cognitiva: acima de 15 pontos (*Canine cognitive dysfunction; CCD*).

### **3.4 Coletas de sangue total para obtenção do plasma rico em plaquetas de cães e ratos e extração de proteínas de hipocampo de ratos**

Em cães, a coleta de sangue (5 mL) foi obtida por venopunção jugular mediante utilização de sistema Vacutainer EDTA K2 (Becton Dickinson, Nova Jersey, USA).

Em ratos, após o teste de RO, os animais foram anestesiados com 4% de isoflurano (Isoforine, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Itapira, SP), diluído em 100% de oxigênio, por meio de máscara facial em vaporizador universal (Anesthetic Vaporizers, Harvard Apparatus, Massachusetts, USA) com reinalação parcial dos gases. A coleta de sangue (1 mL) foi realizada por via intracardíaca. Em

seguida, os animais foram eutanasiados por decapitação. Após esse procedimento, o cérebro foi coletado, submetido ao congelamento imediato em C<sub>6</sub>H<sub>14</sub> (2-metilbutano) e armazenado em freezer a -80°C.

As amostras de sangue total foram submetidas a duas centrifugações (Universal 320R Centrifuge, Hettich, Tuttlingen, Alemanha), sendo a primeira a 300 G por 10 minutos, a 4°C. O plasma foi separado e a porção superior dos eritrócitos foi separada e a amostra acondicionada em um novo tubo. Após a segunda centrifugação (640 x g 10 minutos a 4°C), o sobrenadante (aproximadamente 1 mL) foi isolado e acondicionado em frascos de 1 mL, resultando no Plasma Rico em Plaquetas (PRP). Posteriormente, o PRP foi transferido para frascos de 0,5 mL estéreis devidamente identificados e congelados à -20°C até o momento das análises. Dessa forma, as plaquetas contendo os receptores de adenosina A<sub>1</sub>/A<sub>2A</sub>, BDNF e pró-BDNF foram isoladas para análises posteriores conforme descrito (Ongini; Fredholm, 1996).

Amostras de hipocampo foram separadas e homogeneizadas a 10 kHz (Sonicator XL 2000, Nirco, Barcelona, Espanha) em tampão de lise contendo 50 mM de Tris-HCl (pH 7,4), 0,1% Triton X-100, 4 mM EGTA, 10 mM EDTA e um tablete (para 50 mL) de coquetel de inibidores de proteases e um tablete (para 10 mL) fosfatases (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche, Basileia, Suíça; PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail, Roche, Basileia, Suíça). Os homogenatos foram centrifugados (Universal 320R Centrifuge, Hettich, Tuttlingen, Alemanha) a 12.000 RPM, por 15 min, a 4°C. A partir do sobrenadante foi feita a dosagem da concentração de proteínas (DC Protein Assay, Bio-Rad, Hércules, Califórnia, USA) em cada fração, utilizando-se o método de Bradford (1976). Essa dosagem da quantidade total de proteínas também foi feita nas amostras de PRP obtidas dos ratos e cães.

### **3.5 Análises bioquímicas e moleculares**

#### **3.5.1 Avaliação de Parâmetros Biológicos Relacionados à Cognição**

A densidade das proteínas sinaptofisina, PSD95 (*postsynaptic density-95*), proBDNF, CREB/p(Ser133)CREB, CaMKIV, além dos receptores NMDA-R2B, AMPA (GluA2/3/4), A<sub>1</sub> e A<sub>2A</sub> nas plaquetas ou no hipocampo foi analisada pelo método de *Western blotting*, como segue:

Após a separação das amostras e quantificação das proteínas, quantidades equivalentes de proteínas (20ug) foram separadas por gel de poliacrilamida (SDS-PAGE a 12,5%) a 25 mA por aproximadamente 1h. Após a corrida eletroforética (Mi-

ni-PROTEAN Tetra Cell Systems, Bio-Rad, Hércules, Califórnia, USA), as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose 0,45  $\mu\text{m}$  (Bio-Rad, Hércules, Califórnia, USA) em tampão Tris 25 mM, pH 8,3, glicina 92 mM e SDS 0,1%, a 400 mA por 1 h a 4°C. Terminada a transferência das proteínas, a membrana foi incubada com tampão Tris contendo salina ("Tris buffer saline", TBS) contendo Tween-20 0,1% (Sigma-Aldrich, St-Louis, Missouri, USA) e 2% de BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich, St-Louis, Missouri, USA) por 1 h à temperatura ambiente, sob agitação constante, para o bloqueio das reações inespecíficas do anticorpo primário. Em seguida, a membrana foi incubada com os anticorpos primários em tampão fosfato acrescido de Tween-20 0,1%, e 2% de BSA: sinaptofisina (Abcam, ab8049, 1:500), PSD95 (Cell Signaling, 2507, 1:1000), proBDNF (Sigma-Aldrich, P1374, diluído 1:200), CREB/p(Ser133)CREB (Cell Signaling, D76D11, 1:1000; 87G3, 1:1000), CaMKIV (Cell Signaling, 3362, 1:1000), NMDA-R2B (Abcam, ab65783, 1:1000), AMPA(GluA2/3/4) (Cell Signaling, 2460, 1:1000), A<sub>1</sub> (Novus Biological, NB300-549, 1:250) e A<sub>2A</sub> (Abcam, ab3461, 1:500) por 16h a 4°C. Após a incubação, as membranas foram lavadas três vezes por 10 minutos com tampão fosfato contendo Tween-20 0,1% e incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG conjugado com peroxidase de raiz forte (HRP, de *HorseRadish Peroxidase*) diluído 1:2500 em tampão de bloqueio por 1 hora à temperatura ambiente, sob agitação constante. As marcações foram detectadas por quimioluminescência (Western Lightning ECL Pro, Perkin Elmer, NEL120001EA) e a aquisição digital das imagens foi feita utilizando o equipamento ImageQuant LAS500 (GE Healthcare, Life Science). A análise quantitativa foi realizada pelo ImageJ Software version 1.8.0 (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). Para avaliar a qualidade do controle interno, os níveis de proteína foram normalizados em relação ao sinal obtido pelo GAPDH (Cell signaling, 2118, 1:1000) ou com a coloração do Vermelho Ponceau S (Sigma-Aldrich, St-Louis, Missouri, USA). Foi utilizada a coloração por Ponceau S como controle interno para membranas de PRP, pois os níveis de GAPDH, actina e b-tubulina podem variar de acordo com o indivíduo (Romero-Calvo et al., 2010; Baumgartner et al., 2013).

Para a avaliação dos níveis de BDNF foi feito em homogenato de hipocampo de ratos e plasma pobre em plaquetas (PPP) de cães e ratos, adquirido por duas sequências de centrifugações, após a separação do PRP: 1.000x g durante 15 minutos a 4°C; seguido de 10.000x g durante 10 minutos a 4°C de ratos. Os níveis da



neurotrofina foram avaliados utilizando kit comercial de ELISA “Total BDNF Quantikine” (R&D Systems, DBNT00, Minneapolis, Minnesota, USA). Brevemente, as amostras de sobrenadante dos homogenatos de hipocampo de ratos e PPP de cães e ratos, diluídas 50x em tampão de ensaio, foram colocados na placa previamente preparada com o anticorpo monoclonal anti-BDNF (método *pré-coated*) e esta, incubada por 120 minutos em temperatura ambiente sob agitação constante. Em seguida, após a placa ser lavada três vezes com tampão de lavagem do ensaio, adicionou-se anticorpo monoclonal anti-BDNF ligado à enzima e a mesma foi incubada por 60 minutos em temperatura ambiente sob agitação constante. Foi repetido o ciclo de lavagem e adicionado à solução substrato para o anti-BDNF, e incubado em temperatura ambiente por 30 minutos sob a bancada e protegido da luz. Ao término, adicionou-se a solução finalizadora da reação e a absorção foi lida a 450 nm em leitora de microplacas (PowerWave HT, BioTek, Winooski, Vermont, USA). Os valores de absorbância foram comparados a uma curva padrão com diferentes concentrações de BDNF (0 – 1000 pg/mL) e normalizados pela quantidade total de proteínas da solução, obtendo-se, ao final, os valores em pg/ug.

### **3.6 Análise estatística**

Em cada conjunto de dados a homogeneidade das variâncias foi avaliada utilizando o teste de D'Agostino Pearson.

Dessa forma, somente os dados relacionados à quantificação de BDNF foram expressos como média  $\pm$  erros-padrão e analisados pelo teste t de Student (não pareado e paramétrico).

Para os demais dados, foram expressos como medianas e intervalos interquartis e as diferenças analisadas pelo teste de Mann-whitney (teste t não pareado e não paramétrico).

A avaliação da correlação entre as variáveis numéricas (idade e estado cognitivo) foi feita pela análise de Pearson.

As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

Os dados foram analisados usando GraphPad Prism Version 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, Califórnia, USA).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Avaliação da memória de curta e longa duração de ratos através do teste de reconhecimento de objeto

A avaliação da retenção de memória em ratos jovens e velhos foi realizada utilizando-se o teste de reconhecimento de objetos (RO), que se baseia na capacidade de discriminar entre objetos a que os animais tenham sido previamente expostos e a objetos que não tenham. É possível utilizar essa preferência como um índice de memória relacionada à função hipocampal. Portanto, a redução no índice de RO tem sido descrito como um método simples para a investigação de déficits de memória.

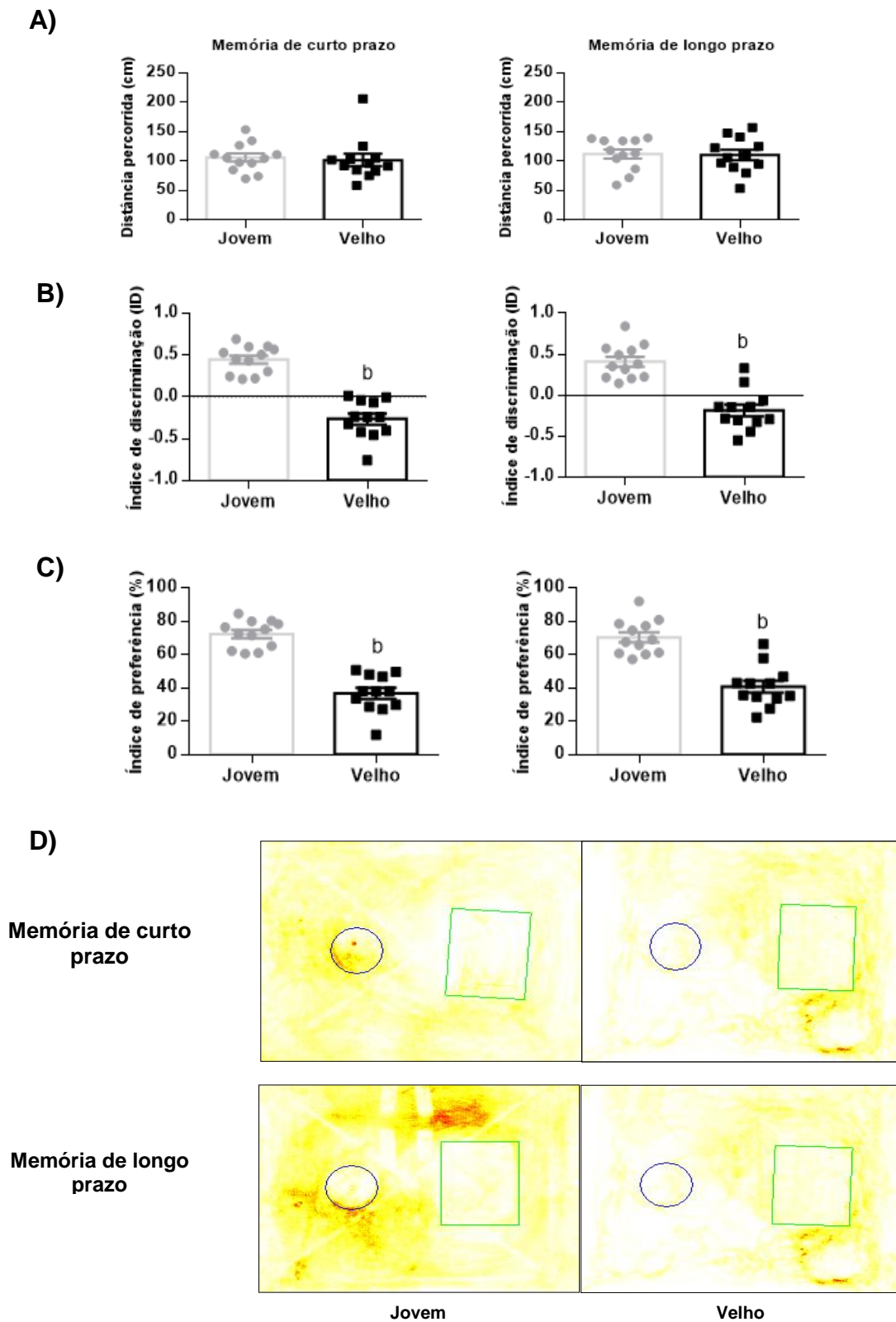
Durante a fase teste relacionado às memórias de curta (MCD) e longa duração (MLD), a atividade locomotora dos animais foi avaliada por meio do software SMART, uma vez que os protocolos exigem que os animais não apresentem déficit locomotor. Como está representado na Figura 1A, não houve diferença significativa entre a distância percorrida pelos animais jovens (105,5cm - 90,98/121,80cm em MCD; 116,20cm - 95,23/129,80cm em MLD) e velhos (94,45cm - 78,79/125,50cm em MCD; 108,20cm - 91,64/129,80cm em MLD) no teste de RO, indicando que os animais não apresentaram déficit de locomoção espontânea.

Na análise da preservação das memórias de curta e longa duração, foi verificado um valor negativo significativamente diferente para o índice de discriminação (ID) dos animais velhos, quando comparado ao valor zero (ao acaso) (MCD: -0,23 - -0,40/-0,12; MLD: -0,21 - -0,33/-0,02). Por outro lado, o grupo jovem apresentou ID positivo (MCD: 0,47 - 0,34/0,55; MLD: 0,36 - 0,27/0,54,  $p < 0,0001$ ) (Figura 1B).

A influência da idade no tempo de exploração foi confirmada pelo índice de preferência (IP), uma vez que os animais velhos permaneceram menos tempo explorando o objeto novo em relação ao familiar na fase teste (MCD: 38,02s - 29,51/43,99s; MLD: 39,27s - 33,01/48,59s), quando comparado aos animais jovens (MCD: 73,94s - 67,16/77,67s; MLD: 68,38s - 63,85/77,08s,  $p < 0,0001$ ) (Figura 1C).

Dessa forma, na sessão teste de MCD e MLD, os animais do grupo jovem demonstraram uma preferência maior pelo objeto novo, o que não foi visto no grupo velho, comprovando o déficit de memória de reconhecimento relacionado à idade.

Figura 1: Gráfico de barras representativo da distância percorrida (A) e da memória (B, C e D) de ratos Wistar jovens e velhos no tempo de 90 minutos (MCD) e 24 horas (MLD)

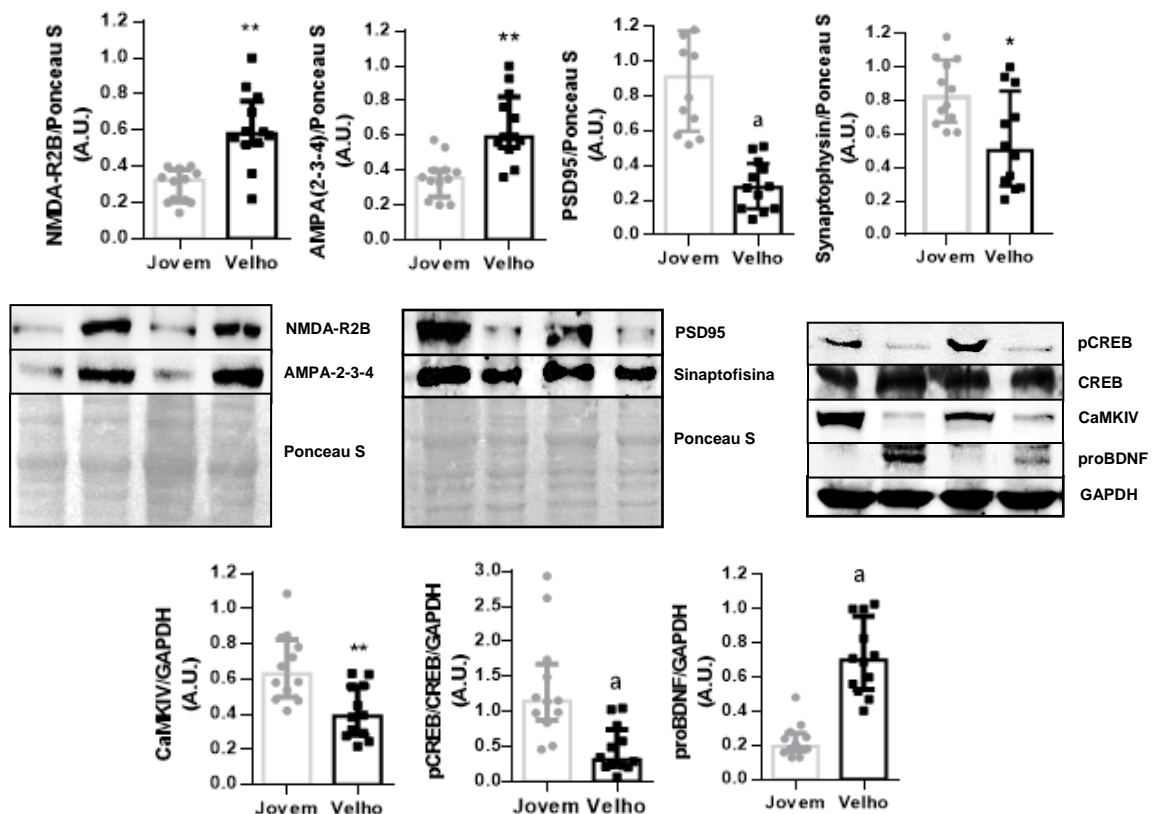


Fonte: autor. A: Distância percorrida pelos animais na caixa de teste; B: Índice de discriminação dos objetos. C: Índice de preferência dos objetos. D: Mapas de calor demonstrando a preferência de objetos pelos animais na fase teste (círculo: objeto novo; retângulo: objeto familiar). A preferência está representada pelo maior traçado amarelo. jovem: n=12, velho: n=12.  $p < 0,0001$ .

#### 4.2 Comparações dos níveis de proteínas relacionadas à formação da memória no hipocampo de ratos jovens e velhos

Na avaliação das proteínas relacionadas à formação/consolidação da memória, foi observado aumento significativo na densidade dos receptores NMDA-R2B (0,58 – 0,47/0,73 UA;  $p < 0,005$ ), AMPA2-3-4 (0,59 – 0,52/0,77 UA;  $p < 0,005$ ) e proBDNF (0,70 – 0,57/0,84 UA;  $p < 0,0001$ ) no grupo velho, comparado aos jovens (0,32 – 0,23/0,35 UA; 0,35 – 0,28/0,43 UA; 0,19 – 0,16/0,29 UA, respectivamente, Figura 2). Por outro lado, nos animais velhos, foi verificada redução significativa da densidade de PSD-95 (0,27 – 0,19/0,37 UA,  $p < 0,0001$ ), sinaptofisina (0,50 – 0,37/0,73 UA,  $p < 0,01$ ), pCREB/CREB (0,31 – 0,25/0,67 UA,  $p < 0,0005$ ) e CAMKIV (0,38 – 0,31/0,50 UA,  $p < 0,005$ ) quando comparado aos animais jovens (0,90 – 0,71/1,10 UA; 0,82 – 0,72/0,97 UA; 1,15 – 0,85/1,82 UA; 0,62 – 0,54/0,79 UA, respectivamente), demonstrando a relação entre a redução da sinalização molecular da memória e a observação comportamental.

Figura 2: Avaliação da densidade das proteínas PSD-95, Sinaptofisina, pCREB/CREB, CAMKIV, proBDNF, receptores NMDA-R2B e AMPA no hipocampo de ratos

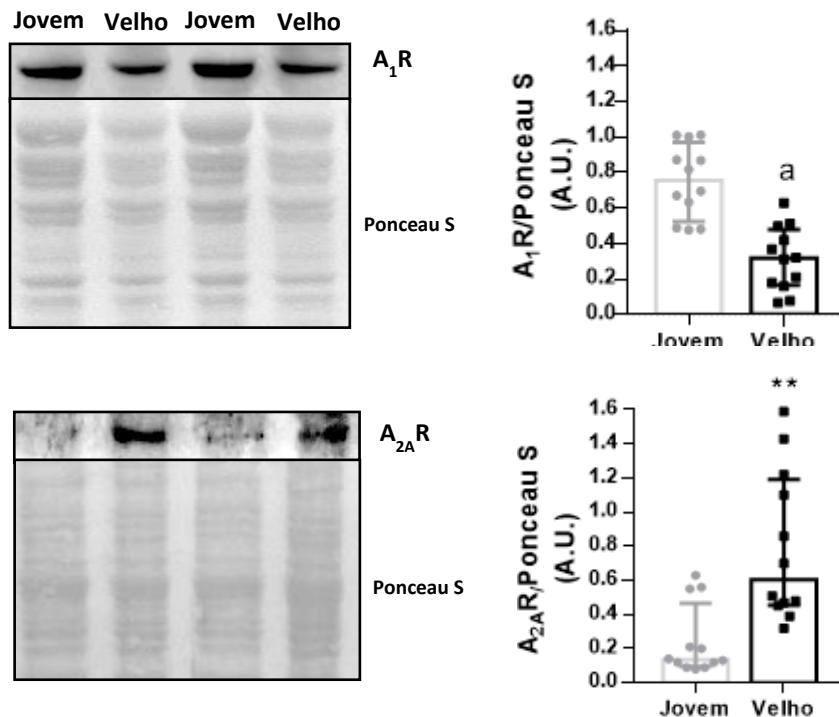


Fonte: autor. Análise densitométrica, em unidades arbitrárias, obtida em ensaio para detecção de PSD95, Sinptofisina, CREB/pCREB, proBDNF, NMDA-R2B e AMPA2-3-4 em hipocampo de ratos usando Ponceau S/GAPDH como controle endógeno. As colunas e barras representam as medianas e intervalos interquartis. Jovem: n=12; Velho=12. \*:p<0,05; \*\*:p<0,001; a:p<0,0001.

### 4.3 Avaliações da densidade dos receptores de Adenosina $A_1$ e $A_{2A}$ no hipocampo de ratos

Na análise da densidade de receptores  $A_1$  e  $A_{2A}$  para adenosina, foi observada redução significativa de  $A_1$  em animais velhos (0,31 – 0,19/0,42 UA;  $p<0,0001$ ) com relação à densidade observada em animais jovens (0,75 – 0,62/0,88 UA). Por outro lado, houve aumento significativo de  $A_{2A}$  em animais velhos (0,60 – 0,51/1,07 UA;  $p<0,005$ ) com relação aos jovens (0,13 – 0,11/0,37 UA), indicando que a idade influencia na densidade dos receptores  $A_1/A_{2A}$  no hipocampo dos animais (Figura 3).

Figura 3: Avaliação da densidade dos receptores de Adenosina  $A_1$  e  $A_{2A}$  no hipocampo de ratos

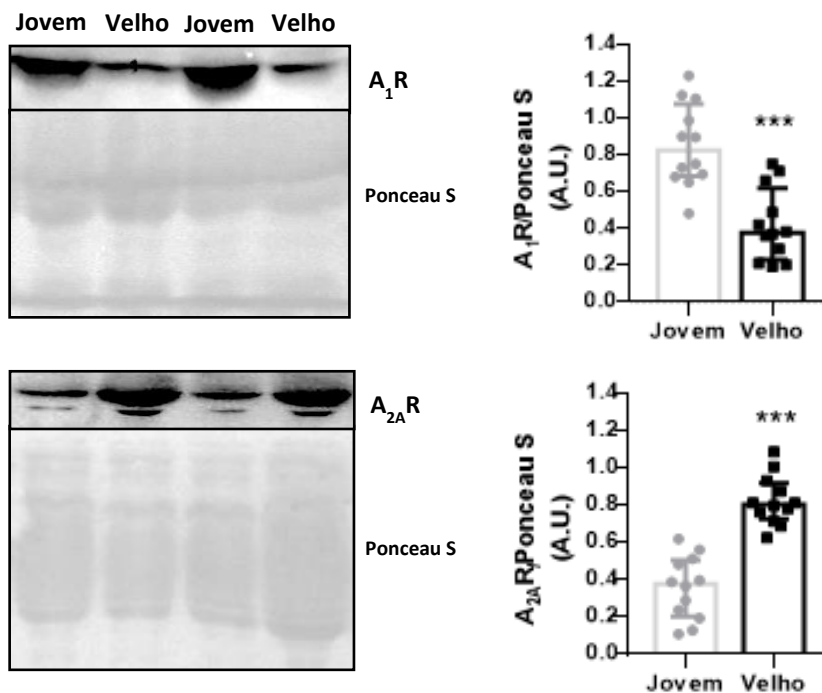


Fonte: autor. Análise densitométrica, em unidades arbitrárias, obtida em ensaio para detecção de  $A_1/A_{2A}$  em hipocampo de ratos usando Ponceau S como controle endógeno. As colunas e barras representam as medianas e intervalos interquartis. Jovem: n=12; Velho: n=12. \*\*: p<0,001; a: p<0,0001.

#### 4.4 Avaliações da densidade dos receptores de Adenosina $A_1$ e $A_{2A}$ no sangue de ratos

Na avaliação dos níveis periféricos dos mesmos receptores, foi observada redução significativa do receptor  $A_1$  em animais velhos (0,37 – 0,29/0,54 UA;  $p < 0,0001$ ) em relação aos jovens (0,82 – 0,71/0,99 UA) e aumento significativo da densidade do receptor  $A_{2A}$  no sangue de animais velhos (0,80 – 0,74/0,90 UA;  $p < 0,0001$ ) em relação aos jovens (0,37 – 0,25/0,46 UA) (Figura 4), indicando que a alteração sanguínea da densidade desses receptores em diferentes idades é comparável com a alteração observada no hipocampo.

Figura 4: Avaliação da densidade dos receptores de Adenosina  $A_1$  e  $A_{2A}$  no sangue de ratos

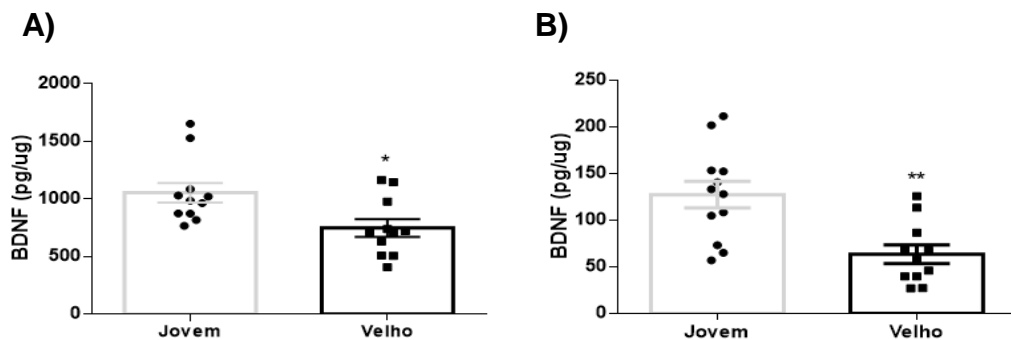


Fonte: autor. Análise densitométrica, em unidades arbitrárias, obtida em ensaio para detecção de  $A_1/A_{2A}$  em plaquetas de ratos usando Ponceau S como controle endógeno. As colunas e barras representam as medianas e intervalos interquartis. Jovem:  $n=12$ , Velho:  $n=12$ . \*\*\*:  $p < 0,0001$ .

#### 4.5 Determinações de BDNF total em hipocampo e sangue de ratos

Com relação à densidade de BDNF no tecido cerebral e no sangue, foi observada redução significativa de 30% (hipocampo) e 50% (sangue) em amostras de animais velhos na quantidade de BDNF total (central e periférico) quando comparadas às amostras de animais jovens ( $1054 \pm 85,53$  pg/ug;  $747,54 \pm 75,79$  pg/ug;  $p < 0,05$ ;  $127,53 \pm 14,25$  pg/ug;  $63,65 \pm 10,03$  pg/ug;  $p < 0,01$ ).

Figura 5 – Determinação de BDNF em hipocampo e sangue de ratos

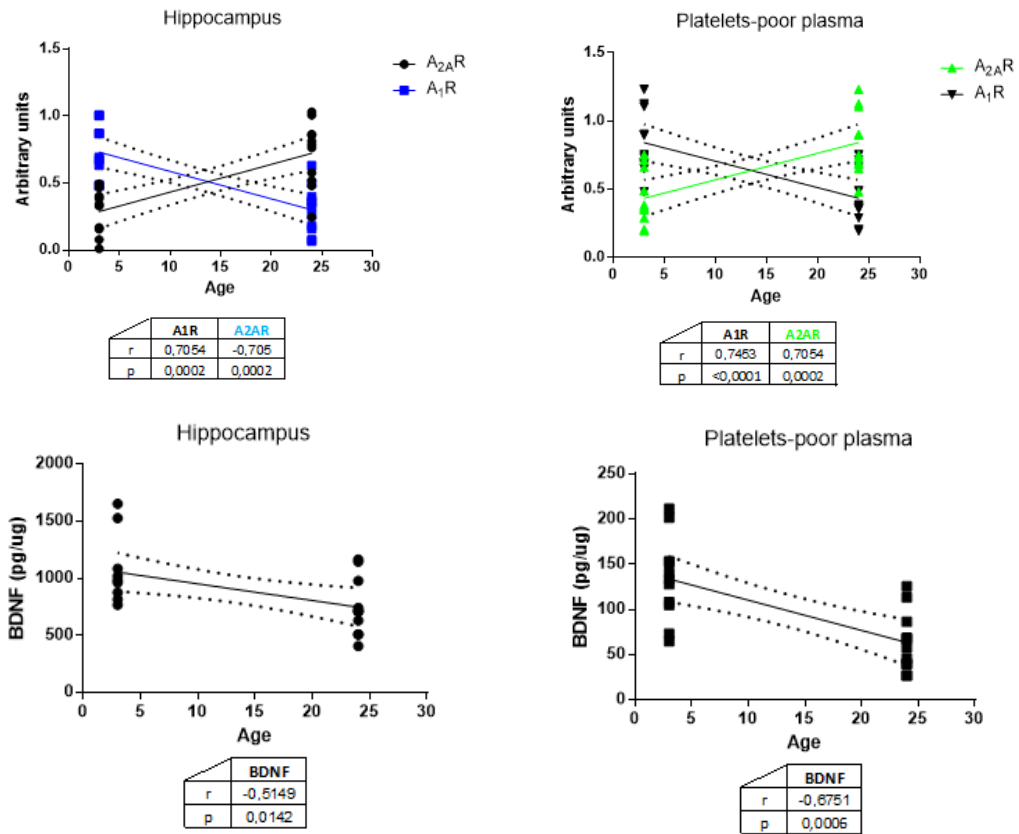


Fonte: autor. A quantificação de BDNF foi realizada em homogenato de hipocampo (A) e PPP (B) de ratos. Houve redução significativa no nível de BDNF no hipocampo e sangue dos animais velhos. As colunas e as barras correspondem às médias  $\pm$  erros-padrão. Jovem: n=12, Velho: n=12. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ .

#### 4.6 Análises de correlação entre a idade e os níveis central e periférico das densidades de receptores de adenosina $A_1/A_{2A}$ e BDNF de ratos

Foi observada relação positiva significativa entre a idade e a densidade de receptores  $A_{2A}$  no hipocampo ( $r=0,7453$ ;  $p < 0,0001$ ) e no sangue dos ratos ( $r=0,7054$ ;  $p < 0,0001$ ). Da mesma forma, houve relação negativa significativa entre a idade e a densidade de receptores  $A_1$  e BDNF no hipocampo ( $r=-0,7828$ ;  $p < 0,0001$ ;  $r=-0,5149$ ;  $p < 0,05$ , respectivamente) e no sangue ( $A_1$ :  $r=-0,7050$ ;  $p < 0,001$  e BDNF:  $r=-0,6751$ ;  $p < 0,001$ ) dos animais. Desse modo, é possível inferir que com o aumento da idade, há uma elevação dos receptores de adenosina  $A_{2A}$  contrastando com os receptores de adenosina  $A_1$  e BDNF, onde houve significativa diminuição.

Figura 6: Características gráficas da análise de correlação entre a densidade de receptores de Adenosina  $A_1$  e  $A_{2A}$  no hipocampo (nível central) e  $A_1$  e  $A_{2A}$  em sangue de ratos.



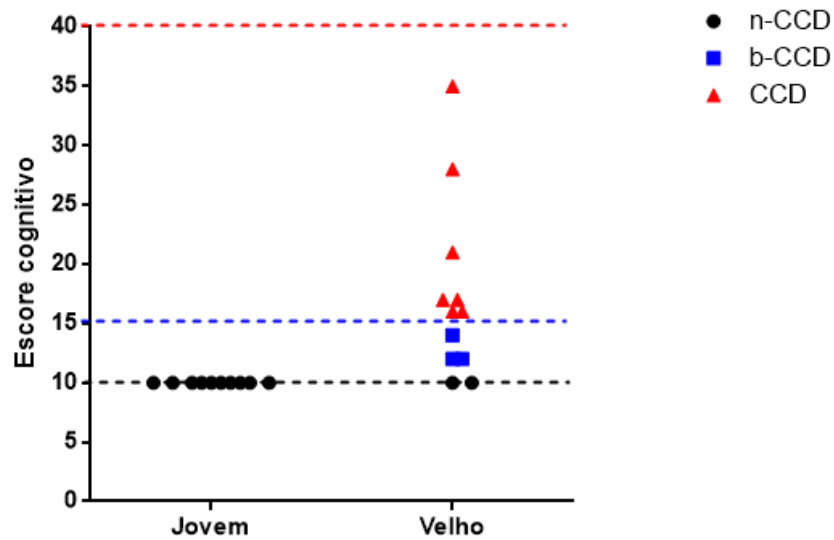
Fonte: autor. Correlação de Pearson,  $p < 0,05$ .

#### 4.7 Avaliação do estado cognitivo dos cães

A avaliação do estado cognitivo foi realizada pelo exame da pontuação cognitiva, que visa rastrear perdas das funções cognitivas dos cães. Na análise da pontuação, foi verificada correlação positiva com a idade ( $r=0,7700$ ;  $p < 0,0001$ ), isto é, quanto mais velho o cão, maior é a pontuação cognitiva (jovem: 10; velho:  $16,36 \pm 7,49$ ) indicando maior perda cognitiva no grupo velho, como está representado na Figura 7.



Figura 7 – Características gráficas dos cães jovens e velhos de acordo com o estado cognitivo



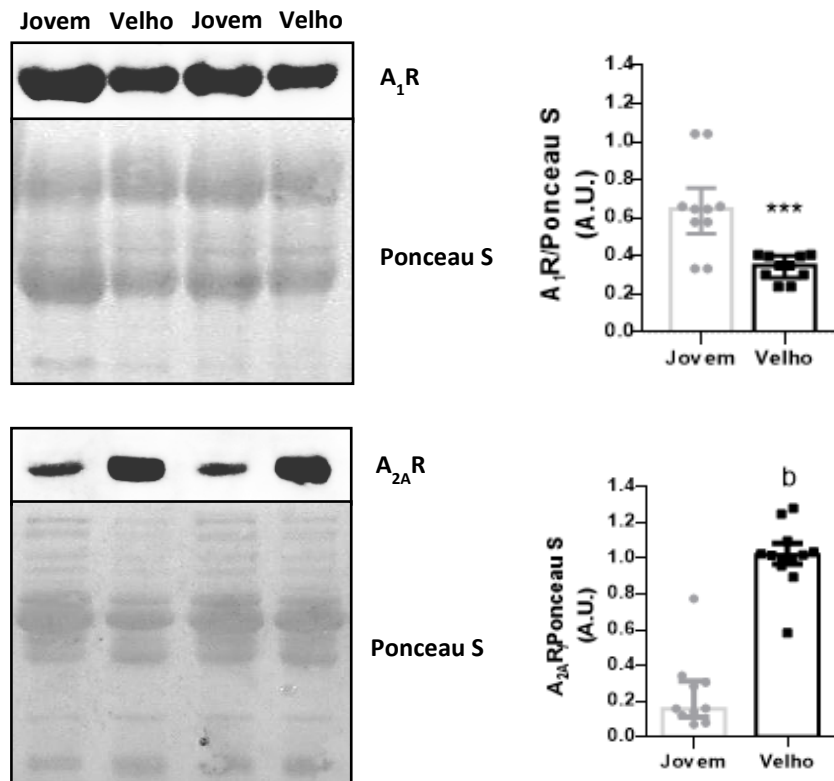
Fonte: autor. Representação gráfica obtida em avaliação cognitiva utilizando-se questionário aplicado aos tutores. n-CCD=10,b-CCD=5,CCD: n=7.

#### 4.8 Avaliações das densidades dos receptores de Adenosina $A_1$ e $A_{2A}$ em sangue de cães

Foram avaliadas as densidades do receptor de Adenosina  $A_1$  e  $A_{2A}$  nas plaquetas de cães a fim de verificar se a densidade dos receptores é influenciada pela idade, como visto em ratos.

Houve redução significativa da densidade de receptores  $A_1$  em amostras de animais velhos (0,34 – 0,29/0,38 UA,  $p < 0,001$ ) quando comparado àquelas de animais jovens (0,64 – 0,48/0,82 UA). Por outro lado, foi observado aumento da densidade de receptores  $A_{2A}$  (1,01 – 0,90/1,12 UA,  $p < 0,0001$ ) quando comparados à densidade desses receptores em animais jovens (0,15 – 0,09/0,39 UA, Figura 8), demonstrando o mesmo padrão de distribuição relacionado à idade, como observado em ratos.

Figura 8: Avaliação da densidade dos receptores de Adenosina A<sub>1</sub> e A<sub>2A</sub> no sangue de cães

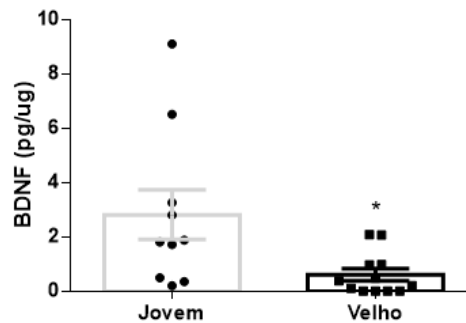


Fonte: autor. Análise densitométrica, em unidades arbitrárias, obtida em ensaio para detecção de A<sub>1</sub>/A<sub>2A</sub> em PRP de cães usando Ponceau S como controle endógeno. As colunas e barras representam as medianas e intervalos interquartis. Jovem: n=10, Velho: n=12. \*\*\*: p<0,001; b: p<0,0001.

#### 4.9 Determinação de BDNF total em sangue de cães

Considerando que a idade influenciou no nível de receptores de Adenosina A<sub>1</sub> e A<sub>2A</sub> no sangue de ratos e cães, os níveis de BDNF também foram avaliados em sangue de cães. Assim, como verificado em ratos, houve redução significativa dessa neurotrofina em velhos ( $0,62 \pm 0,22$  pg/ $\mu$ g; p<0,05), quando comparados com os níveis observados em jovens ( $2,82 \pm 0,91$  pg/ $\mu$ g), indicando que a expressão de BDNF parece manter um padrão semelhante nas duas espécies.

Figura 9 – Determinação de BDNF total em sangue de cães

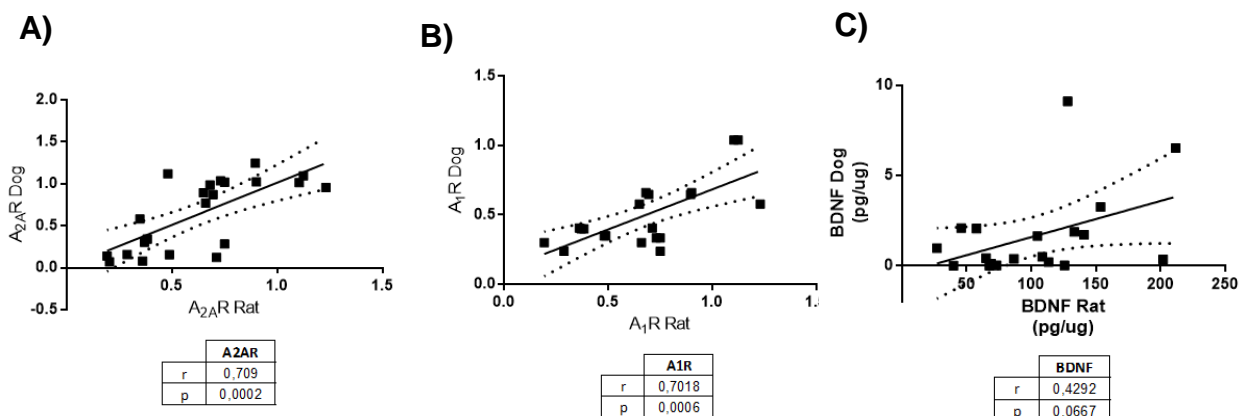


Fonte: autor. A dosagem de BDNF foi realizada em sangue de cães. Houve redução significativa no nível de BDNF em velhos, quando comparados aos jovens. Jovem: n=10, Velho: n=12. \*: p<0,05.

#### 4.10 Análises de correlação de $A_1$ , $A_{2A}$ e BDNF periféricos de cães e ratos: relação entre a densidade das proteínas e a idade

A fim de realizar uma comparação translacional da relação entre a densidade das proteínas e a idade, as densidades das proteínas entre as espécies foram comparadas. Houve relação positiva e significativa na densidade de receptores  $A_1$  (p<0,001) e  $A_{2A}$  (p<0,001) (Figura 10A e B). Por outro lado, não foi observada relação significativa de BDNF entre as espécies (Figura 10C).

Figura 10 – Características gráficas da análise de correlação entre os possíveis biomarcadores periféricos em PRP de cães e ratos.



Fonte: autor. Correlação de Pearson da densidade proteica de  $A_1$ ,  $A_{2A}$  e BDNF entre as duas espécies avaliadas. Cães: Jovens: n=10, Velhos: n=12; Ratos: Jovens: n=12, Velhos: n=12.

## 5. DISCUSSÃO

Semelhante aos seres humanos, os cães desenvolvem progressivas mudanças cerebrais relacionados à idade que podem ser acompanhadas por declínio cognitivo e déficits em aprendizagem, memória e confusão espacial. Uma síndrome de desenvolvimento natural e específica relacionada à idade é conhecida como SDCC, e possui muitos fatores neuropatológicos e clínicos com os estágios iniciais da DA (Davis; Head, 2014; Youssef et al., 2016).

Até o momento, mudanças no comportamento e rotinas diárias são consideradas os marcadores clínicos mais importantes da SDCC em cães e seu diagnóstico são primariamente dirigidos por questionários e escalas de avaliação clínica para a detecção de alterações comportamentais dentro das principais categorias de perdas cognitivas. Apesar dos questionários e escalas serem ferramentas amplamente utilizadas para o diagnóstico de SDCC e DA, sabe-se que há baixa sensibilidade no diagnóstico de indivíduos que apresentam declínio cognitivo leve, precedendo o limítrofe ("*borderline*", b-CCD) ou Comprometimento Cognitivo Leve (CCL) em humanos. Além disso, há relatos de que o declínio cognitivo e o processo patológico da SDCC e DA inicia-se de um a dois anos em cães (Schütt et al., 2015) e um a sete anos em seres humanos (Beason-Held et al., 2013) antes dos primeiros sinais clínicos, um estado prodromático caracterizado por pequenas perdas em habilidades cognitivas, as quais muitas vezes não são detectadas pelos clínicos. Assim, a procura por biomarcadores periféricos que podem diagnosticar ou prever o estado cognitivo é de grande interesse, pois torna possível traçar uma intervenção do declínio cognitivo de forma precoce e, conseqüentemente, estabelecer medidas efetivas com o objetivo de prevenir e/ou retardar a SDCC e DA.

A cafeína, encontrada no café e consumida em todo o mundo, é uma metilxantina com propriedades psicoestimulantes devido à sua capacidade de antagonizar os receptores de adenosina A<sub>1</sub> (1  $\mu$ M pKi = 4,54 em ratos; 4,97 em humanos) e A<sub>2A</sub> (1  $\mu$ M pKi = 4,32 em ratos; 4,63 em humanos) (Van Galen et al., 1994; de Mendonca; Cunha, 2010; Müller; Jacobson, 2011). Recentemente, estudos em animais (Panza et al., 2015) e dados epidemiológicos de seres humanos (Ritchie et al., 2007; Simonin et al., 2013; Flaten et al., 2014) têm demonstrado efeitos benéficos à cognição com o uso da cafeína, que foi associado à uma diminuição do risco de declínio cognitivo relacionado à idade e desenvolvimento de DA (Costenla et al., 2010). Desse modo, surgiu o interesse do grupo em investigar os receptores de adenosina e o

BDNF como possíveis biomarcadores periféricos da manutenção da memória, já que a nossa hipótese é que haja um perfil semelhante entre os biomarcadores propostos em nível central e periférico, tornando-os relevantes para o diagnóstico/terapêutica da SDCC e DA.

Inicialmente, a fim de caracterizar o declínio cognitivo, foi realizado o teste de RO para demonstrar a perda de memória entre os grupos de ratos jovens (3 meses) e velhos (22 meses), já que é possível utilizar a preferência pelo objeto novo como um índice de memória relacionada à função hipocampal (Goulart et al., 2010; Antunes; Biala, 2012; Vogel-Ciernia; Wood, 2014). Foi observada perda de memória de curto prazo (90 minutos após o treino) e longo prazo (24 horas após o treino) no grupo velho, confirmando os déficits de memória de reconhecimento relacionados à idade.

Após a constatação do déficit de memória, as densidades das principais proteínas envolvidas na formação e consolidação da memória foram analisadas, a fim de verificar se havia alterações entre ratos jovens e velhos que pudessem ser relacionadas aos resultados comportamentais.

Inicialmente, observou-se, como mostrado na Figura 2, um marcado aumento da densidade de receptores de glutamato (NMDA-R2B e AMPA2-3-4) no hipocampo de velhos juntamente com a redução da proteína de ancoragem do NMDA (PSD-95), comparado aos jovens. O receptor NMDA apresenta uma estrutura di ou triheteromérica, sendo composto obrigatoriamente por duas subunidades GluN1 associado a subunidades GluN2 ou uma mistura de GluN2 e GluN3. No hipocampo há predomínio da estrutura di-heteromérica com subunidades GluN1-N2A e GluN1-N2B (Paoletti et al. 2013). Sabe-se que tanto na SDCC quanto na DA ocorre aumento significativo da densidade de placas  $\beta$ -amilóide no hipocampo, as quais induzem aumento na substituição da subunidade Glu-N2A do NMDA com a Glu-N2B (via calpaínas) facilitando a ligação do receptor a SAP-102 (proteína associada à sinapse – 102), que apresenta alta mobilidade para regiões extras sinápticas (Groc et al., 2009; Gladding; Raymond, 2011; Youssef et al., 2016). Com isso, ao invés do NMDA-R2B ser internalizado por endocitose para realizar a sua reciclagem, se difundirá com maior intensidade lateralmente ao sítio extra sináptico, o qual constitui um importante centro de vias de sinalização que levam à morte neuronal por apoptose (via caspase-3) (Liu et al., 2007; Hardingham; Bading, 2010; Gladding; Raymond, 2011). Com relação à PSD-95, a literatura mostra que essa proteína de ancoragem se liga

a filamentos do citoesqueleto e a proteínas envolvidas em conectividade sináptica. Além disso, participa do controle da arquitetura e morfologia da sinapse. Desse modo, ela é crucial para a força e maturação sináptica, indicando a importância da sua estabilidade para a regulação do tráfego do receptor, desde o recrutamento de receptores do sítio extra sináptico para a zona ativa, até a modificação de proteínas de sinalização intracelulares (Elias; Nicoll, 2007); sugerindo que essa interação é crítica para a LTP e neuroplasticidade (Proctor et al., 2011).

Após a ativação dos receptores AMPA e NMDA para a estabilização da LTP, há a ativação do CREB. O CREB (*cAMP response element binding protein*) é um fator de transcrição responsável por regular a síntese de proteínas necessárias para estabilizar as mudanças sinápticas que são desencadeadas durante o aprendizado. A sua atividade é regulada por fosforilação, principalmente na Ser133, através de diversas proteínas, entre elas a CAMKIV (proteína quinase IV dependente de cálcio/calmodulina), que atua como efetora da calmodulina (Naz et al., 2016) e induz ao aumento da densidade de diferentes proteínas, como o BDNF, que garantirá as mudanças estruturais e conseqüentemente, a neuroplasticidade. No presente estudo, os níveis de CAMKIV-CREB fosforilado na Ser133 e BDNF estavam significativamente diminuídos no hipocampo dos ratos velhos (Figura 4 e 5) comparado aos jovens, sugerindo redução da funcionalidade da LTP. Além dos baixos níveis de BDNF total, houve pronunciado aumento da densidade do proBDNF no grupo velho, comparado aos jovens, confirmando que há um desequilíbrio entre as duas formas e que os níveis de BDNF maduro efetivamente estão diminuídos no grupo velho, indicando uma perda das principais funções da via, quais sejam no crescimento e diferenciação de novos neurônios, maturação e refinamento da arborização dendrítica e plasticidade sináptica (Cohen-Cory et al., 2010; Beerli; Sonnen, 2016). Além disso, sabe-se que o aumento dos níveis de proBDNF pode ativar seletivamente o receptor de neurotrofina p75, induzindo a via de sinalização pró-apoptótica (Teng, 2005).

Um dos sistemas que modula a manutenção da LTP, e conseqüentemente, a memória ao longo do envelhecimento é o sistema purinérgico, sobretudo, através da ação inibitória e facilitatória dos receptores  $A_1$  e  $A_{2A}$  sobre diversos receptores ligados à via glutamatérgica no hipocampo (Pagnussat et al., 2015). Os efeitos por eles causados modulam a transmissão sináptica basal e a neuroplasticidade cerebral, contribuindo para a codificação da informação em circuitos neuronais, o que afeta diferentes comportamentos, desde a memória até a locomoção (Chen et al., 2013).

Além disso, há a demonstração de que o aumento da expressão do  $A_{2A}$  em animais está associado à neurodegeneração e déficit de memória, e que o uso de antagonistas (SCH 58261) preveniu esse déficit induzido por escopolamina (Costenla et al., 2011; Pagnussat et al., 2015). Em concordância com esses achados, no presente estudo foi identificada uma relação inversa da densidade desses receptores nas diferentes idades, ou seja, enquanto foi observada uma redução significativa da densidade de receptores  $A_1$  em animais velhos, foi verificado aumento da densidade de receptores  $A_{2A}$  nesses animais, em relação aos jovens. Essa relação inversa foi verificada tanto em ratos como em cães e pode estar associada a diversos efeitos negativos para a manutenção da memória de longa duração no processo de envelhecimento, tais como inibição da recaptação do glutamato pelos astrócitos (Orr et al., 2015), aumento da ativação da via excitatória pelos receptores NMDA-R2B extra sináptico (Mouro et al., 2018) e, conseqüentemente, indução da neurodegeneração. Wei et al. (2011) demonstraram a importância do  $A_1$  no hipocampo, pois o mesmo está envolvido em um mecanismo de retroalimentação negativo sobre os receptores  $A_{2A}$  e, dessa forma, previne os efeitos deletérios (como a intensificação da resposta inflamatória) desencadeados por uma superexpressão desse receptor no hipocampo de velhos. Além disso, Angulo et al. (2003) relataram uma significativa colocalização de receptores  $A_1$  com placas de beta-amilóide em córtex e hipocampo de indivíduos acometidos pela DA e em células de neuroblastoma humanas, sugerindo que a ativação do  $A_1$  resultou em aumento de PKC, p21 Ras e ERK1/2, levando ao aumento da formação de fragmentos solúveis de beta-amilóide. Por outro lado, o aumento da densidade de receptores  $A_{2A}$  leva à ativação da  $\beta$ -secretase (via BACE-PS1) e conseqüentemente, à deposição de placas de  $\beta$ -amilóide, o que causa uma ativação da via de sinalização p38-MAPK culminando em sinaptotoxicidade (Arendash et al., 2006; Thathiah; de Strooper, 2011). Esses resultados podem ser de grande valia em cães acometidos por SDCC, pois Youssef et al. (2016) relataram que uma das principais características neuropatológicas da doença é o acúmulo de placas de  $\beta$ -amilóide no córtex pré-frontal e hipocampo.

Leite et al. (2011) estudaram os efeitos para a memória do antagonista não seletivo (cafeína) e seletivo para  $A_{2A}$  (SCH58261) em ratos jovens e velhos, onde demonstraram que no grupo velho, sob efeito do antagonista seletivo, houve uma elevada retenção de memória quando comparado à cafeína e salina, demonstrando

que no jovem, onde não há o desbalanço entre os receptores  $A_1$  e  $A_{2A}$ , o fármaco não foi efetivo em melhorar o desempenho cognitivo.

Assim, partindo dos achados já relatados dos biomarcadores no sistema nervoso central (SNC) e confirmando que os ratos apresentaram alterações comportamentais e moleculares que justificassem a perda de memória, iniciamos a investigação sobre alterações das densidades das proteínas no sistema periférico de cães. Nosso principal objetivo foi verificar se os níveis periféricos das proteínas nas diferentes idades seriam semelhantes ao observado no SNC de ratos, a fim de validar os nossos achados. Como mostrado na Figura 8, foi verificado que nos ratos, os níveis de BDNF total,  $A_1$  e  $A_{2A}$  no hipocampo comparado ao sangue são semelhantes, sugerindo que poderíamos utilizá-los em cães para o estudo do estado cognitivo.

Sendo assim, foram avaliados os níveis periféricos dos receptores  $A_1$ ,  $A_{2A}$  e do BDNF de cães jovens (1-2 anos) e velhos (acima de 10 anos). Como mostrado na Figura 9, identificou-se uma diminuição dos níveis de BDNF total no sangue de cães velhos, comparado aos jovens, como visto nos ratos. Embora não haja relatos desse achado em cães, a literatura indica que a quantidade de BDNF no cérebro é proporcional ao declínio cognitivo, ou seja, indivíduos que apresentaram maiores níveis de BDNF no cérebro apresentaram, também, declínio cognitivo mais lento, quando comparado aos indivíduos com níveis menores (Buchman et al., 2016). Desse modo, a dosagem do BDNF periférico pode ser uma ferramenta para avaliar o declínio cognitivo de forma não invasiva.

Quanto aos receptores de adenosina  $A_1$  e  $A_{2A}$ , o mesmo perfil observado em ratos, em relação à idade e o declínio cognitivo, foram observados em cães. Em cães velhos, com déficits cognitivos, há uma diminuição da densidade de  $A_1$  e aumento de  $A_{2A}$ , sendo observado o contrário em jovens cognitivamente intactos. Consideramos esse achado promissor, pois além de não haver relatos desse desbalanço na periferia, colocamos a possibilidade de avaliá-los em cães acometidos por SDCC para fins de diagnóstico e alvo terapêutico.

Apesar de reconhecermos a necessidade de testá-los em um número amostral maior, acreditamos que o presente trabalho tem importância uma vez que na população canina, não há estudos de associação entre as variáveis  $A_{2A}$ ,  $A_1$  e BDNF na SDCC. Além disso, o trabalho almejou contribuir com os estudos de biomarcadores para auxiliar no diagnóstico na fase pré-clínica da DA e SDCC.



## 6. CONCLUSÕES

Após avaliar a memória e realizar análise comparativa translacional entre os níveis de proteínas relacionadas à formação e manutenção da memória em animais jovens e velhos, podemos concluir que:

- ✓ Ratos velhos com déficit de memória de reconhecimento e alterações moleculares da via da LTP apresentaram aumento de  $A_{2A}$  e redução de  $A_1$  e BDNF no hipocampo e sangue.
- ✓ Cães velhos com declínio cognitivo apresentaram aumento de  $A_{2A}$  e redução de  $A_1$  e BDNF no sangue.
- ✓ Pela a análise translacional entre ratos e cães, demonstrou-se que as variáveis propostas podem ser consideradas como potenciais biomarcadores para o declínio cognitivo em cães e ratos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aid, T.; Kazantseva, A.; Piirsoo, M.; Palm, K.; Timmusk, T. Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. **Journal of neuroscience research**, v. 85, n. 3, p. 525-535, 2007.
- Akingbade, O.; Gibson, C.; Kalaria, R.; Mukaetova-Ladinska, E. Platelets: Peripheral Biomarkers of Dementia?. **Journal of Alzheimer's Disease**, n. Preprint, p. 1-25, 2018.
- Angelucci, M. M.; Vital, M. A.; Cesário, C.; Zadusky, C. R.; Rosalen, P. L.; da Cunha, C. The effect of caffeine in animal models of learning and memory. **European journal of pharmacology**, v. 373, n. 2-3, p. 135-140, 1999.
- Angulo, E.; Casadó, V.; Mallol, J.; Canela, E. I.; Viñals, F.; Ferrer, I.; Lluís, C.; Franco, R. A1 adenosine receptors accumulate in neurodegenerative structures in Alzheimer's disease and mediate both amyloid precursor protein processing and tau phosphorylation and translocation. **Brain pathology**, v. 13, n. 4, p. 440-451, 2003.
- Antunes, M.; Biala, G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. **Cognitive processing**, v. 13, n. 2, p. 93-110, 2012.
- Araujo, J. A.; Nobrega, J. N.; Raymond, R.; Milgram, N. W. Aged dogs demonstrate both increased sensitivity to scopolamine impairment and decreased muscarinic receptor density. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 98, n. 2, p. 203-209, 2011.
- Araujo, J. A.; Studzinski, C. M.; Milgram, N. W. Further evidence for the cholinergic hypothesis of aging and dementia from the canine model of aging. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 29, n. 3, p. 411-422, 2005.
- Arendash, G. W.; Schleif, W.; Rezai-Zadeh, K.; Jackson, E. K.; Zacharia, L. C.; Cracchiolo, J. R.; Shippy, D. Tan, J. Caffeine protects Alzheimer's mice against cognitive impairment and reduces brain  $\beta$ -amyloid production. **Neuroscience**, v. 142, n. 4, p. 941-952, 2006.
- Assaife-Lopes, N.; Sousa, V. C.; Pereira, D. B.; Ribeiro, J. A.; Sebastião, A. M. Regulation of TrkB receptor translocation to lipid rafts by adenosine A<sub>2A</sub> receptors and its functional implications for BDNF-induced regulation of synaptic plasticity. **Purinergic signalling**, v. 10, n. 2, p. 251-267, 2014.
- Baumgartner, R.; Umlauf, E.; Veitinger, M.; Guterres, S.; Rappold, E.; Babeluk, R.; Mitulovic, G.; Oehler, R.; Zellner, M. Identification and validation of platelet low biological variation proteins, superior to GAPDH, actin and tubulin, as tools in clinical proteomics. **Journal of proteomics**, v. 94, p. 540-551, 2013.
- Beason-Held, L. L.; Goh, J. O.; An, Y.; Kraut, M. A.; O'Brien, R. J.; Ferrucci, L.; Resnick, S. M. Changes in brain function occur years before the onset of cognitive impairment. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 46, p. 18008-18014, 2013.
- Beeri, M. S.; Sonnen, J. Brain BDNF expression as a biomarker for cognitive reserve against Alzheimer disease progression. **Neurology**, v. 129, p. 702-703, 2016.

Borras, D.; Ferrer, I.; Pumarola, M. Age-related changes in the brain of the dog. **Veterinary pathology**, v. 36, n. 3, p. 202-211, 1999.

Borota, D.; Murray, E.; Keceli, G.; Chang, A.; Watabe, J. M.; Ly, M.; Toscano, J. P.; Yassa, M. A. Post-study caffeine administration enhances memory consolidation in humans. **Nature neuroscience**, v. 17, n. 2, p. 201, 2014.

Botton, P. H.; Costa, M. S.; Ardaís, A. P.; Miorananza, S.; Souza, D. O.; da Rocha, J. B.; Porciuncula, L. O. Caffeine prevents disruption of memory consolidation in the inhibitory avoidance and novel object recognition tasks by scopolamine in adult mice. **Behavioural brain research**, v. 214, n. 2, p. 254-259, 2010.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

Briones, F.; Cáceres, T.; Jarpa, M. Detección de b-Amiloide, Proteína TAU Hiperfosforilada y Ubiquitina por Técnica de Inmunohistoquímica en Cerebros de Caninos Mayores de 10 Años. **International Journal of Morphology**, v. 28, n. 4, p. 1255-1261, 2010.

Buchman, A. S.; Yu, L.; Boyle, P. A.; Schneider, J. A.; de Jager, P. L.; Bennett, D. A. Higher brain BDNF gene expression is associated with slower cognitive decline in older adults. **Neurology**, v. 86, n. 8, p. 735-741, 2016.

Calderón-Garcidueñas, L.; Mora-Tiscareno, A.; Ontiveros, E.; Gomez-Garca, G.; Barragan-Meija, G.; Broadway, L.; Chapman, S.; Valencia-Salazar, G.; Jewells, V.; Maronpot, R. R.; Henriquez-Roldan, C.; Perez-Guille, B.; Torres-Jardon, R.; Herrit, L.; Brooks, D.; Osnaya-Brizuela, N.; Monroy, M. E.; Gonzalez-Maciél, A.; Reynoso-Robles, R.; Villarreal-Calderon, R.; Solt, A. C.; Engle, R. W. Air pollution, cognitive deficits and brain abnormalities: a pilot study with children and dogs. **Brain and cognition**, v. 68, n. 2, p. 117-127, 2008.

Canas, P. M.; Cunha, R. A.; Agostinho, P. Adenosine receptors in Alzheimer's disease. In: Borea, P.; Varani, K.; Gessi, S.; Merighi, S.; Vincenzi, F. (eds) **The Adenosine Receptors**, Human Press, v. 32, p.259-280, 2018.

Cao, C.; Loewenstein, D. A.; Lin, X.; Zhang, C.; Wang, L.; Duara, R.; Wu, Y.; Giannini, A.; Bai, G.; Cai, J.; Greig, M.; Schofield, E.; Ashok, R.; Small, B.; Potter, H.; Arendash, G. W. High blood caffeine levels in MCI linked to lack of progression to dementia. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 30, n. 3, p. 559-572, 2012.

Casey, M.; Marguire, C.; Kelly, A.; Gooney, M. A.; Lynch, M. A. Analysis of the pre-synaptic signaling mechanisms underlying the inhibition of LTP in rat dentate gyrus by the tyrosine kinase inhibitor, genistein. **Hippocampus**, v. 12, n. 3, p. 377-385, 2002.

Chen, J.; Eltzschig, H. K.; Fredholm, B. B. Adenosine receptors as drug targets—what are the challenges?. **Nature reviews Drug discovery**, v. 12, n. 4, p. 265, 2013.

Cohen-Cory, S.; Kidane, A. H.; Shirkey, N. J.; Marshak, S. Brain-derived neurotrophic factor and the development of structural neuronal connectivity. **Developmental neurobiology**, v. 70, n. 5, p. 271-288, 2010.

Costenla, A. R.; Cunha, R. A.; De Mendonça, A. Caffeine, adenosine receptors, and synaptic plasticity. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 20, n. s1, p. S25-S34, 2010.

Cunha, R. A.; Agostinho, P. M. Chronic caffeine consumption prevents memory disturbance in different animal models of memory decline. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 20, n. s1, p. S95-S116, 2010.

Davis, P. R.; Head, E. Prevention approaches in a preclinical canine model of Alzheimer's disease: benefits and challenges. **Frontiers in pharmacology**, v. 5, p. 47, 2014.

Elias, G. M.; Nicoll, R. A. Synaptic trafficking of glutamate receptors by MAGUK scaffolding proteins. **Trends in cell biology**, v. 17, n. 7, p. 343-352, 2007.

Eskelinen, M. H.; Ngandu, T.; Tuomilehto, J.; Soininen, H.; Kivipelto, M. Midlife coffee and tea drinking and the risk of late-life dementia: a population-based CAIDE study. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 16, n. 1, p. 85-91, 2009.

Ennaceur, A.; Delacour, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behavioural brain research**, v. 31, n. 1, p. 47-59, 1988.

Epel, E. S.; Blackburn, E. H.; Lin, J.; Dhabhar, F. S.; Adler, N. E.; Morrow, J. D.; Cawthon, R. M. Accelerated telomere shortening in response to life stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 49, p. 17312-17315, 2004.

Espinosa, J.; Rocha, A.; Nunes, F.; Costa, M. S.; Schein, V.; Kazlauckas, V.; Kalinine, E.; Souza, D. O.; Cunha, R. A.; Porciuncula, L. O. Caffeine consumption prevents memory impairment, neuronal damage, and adenosine A2A receptors upregulation in the hippocampus of a rat model of sporadic dementia. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 34, n. 2, p. 509-518, 2013.

Fick, L. J.; Fick, G. H.; Li, Z.; Cao, E.; Bao, B.; Heffelfinger, D.; Parker, H; G.; Ostrander, E. A.; Riabowol, K. Telomere length correlates with life span of dog breeds. **Cell reports**, v. 2, n. 6, p. 1530-1536, 2012.

Flaten, V.; Laurent, C.; Coelho, J. E.; Sandau, U.; Batalha, V. L.; Burnouf, S.; Hamdane, M.; Humez, S.; Boison, D.; Lopes, L. V.; Blue, L.; Blum, D. From epidemiology to pathophysiology: what about caffeine in Alzheimer's disease? **Biochem Soc Trans**, v. 42, p. 587-592.

Gilmore, K. M.; Greer, K. A. Why is the dog an ideal model for aging research?. **Experimental gerontology**, v. 71, p. 14-20, 2015.

Gladding, C. M.; Raymond, L. A. Mechanisms underlying NMDA receptor synaptic/extrasynaptic distribution and function. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 48, n. 4, p. 308-320, 2011.

Goulart, B. K.; de Lima, M. N.; de Farias, C. B.; Reolon, G. K.; Almeida, V. R.; Quevedo, J.; Kapczinski, F.; Schroder, N.; Roesler, R. Ketamine impairs recognition memory consolidation and prevents learning-induced increase in hippocampal brain-derived neurotrophic factor levels. **Neuroscience**, v. 167, n. 4, p. 969-973, 2010.

Groc, L.; Bard, L.; Choquet, D. Surface trafficking of N-methyl-D-aspartate receptors: physiological and pathological perspectives. **Neuroscience**, v. 158, n. 1, p. 4-18, 2009.

Hardingham, G. E.; Bading, H. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signaling: implications for neurodegenerative disorders. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 11, n. 10, p. 682, 2010.

Head, E. A canine model of human aging and Alzheimer's disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1832, n. 9, p. 1384-1389, 2013.

Heinrich, G.; Pagtakhan, C. J.. Both 5'and 3'flanks regulate Zebrafish brain-derived neurotrophic factor gene expression. **BMC neuroscience**, v. 5, n. 1, p. 19, 2004.

Hotulainen, P.; Hoogenraad, C. C. Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. **The Journal of cell biology**, v. 189, n. 4, p. 619-629, 2010.

Izquierdo, I.; Cammarota, M.; da Silva, W. C.; Bevilaqua, L. R.; Rossato, J. I.; Bonini, J. S.; Mello, P.; Benetti, F.; Costa, J. C.; Medina, J. H. The evidence for hippocampal long-term potentiation as a basis of memory for simple tasks. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 80, n. 1, p. 115-127, 2008.

Kaeberlein, M.; Creevy, K. E.; Promislow, D. E. The dog aging project: translational geroscience in companion animals. **Mammalian genome**, v. 27, n. 7-8, p. 279-288, 2016.

Kandel, E. R. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. **Science**, v. 294, n. 5544, p. 1030-1038, 2001.

Landsberg, G. M.; Nichol, J.; Araujo, J. A. Cognitive dysfunction syndrome: a disease of canine and feline brain aging. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 42, n. 4, p. 749-768, 2012.

Landsberg, G. M.; Araujo, J. A. Behavior problems in geriatric pets. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 35, n. 3, p. 675-698, 2005.

Laurent, C.; Eddarkaoui, S.; Derisbourd, M.; Leboucher, A.; Demeyer, D.; Carrier, S.; Schneider, M.; Hamdane, M.; Muller, C. E.; Buee, L.; Blum, D. Beneficial effects of caffeine in a transgenic model of Alzheimer's disease-like tau pathology. **Neurobiology of aging**, v. 35, n. 9, p. 2079-2090, 2014.

Lebmann, V.; Brigadski, T. Mechanisms, locations, and kinetics of synaptic BDNF secretion: an update. **Neuroscience research**, v. 65, n. 1, p. 11-22, 2009.

Lebois, M.; Josefsson, E. C. Regulation of platelet lifespan by apoptosis. **Platelets**, v. 27, n. 6, p. 497-504, 2016.

Leite, M. R.; Wilhelm, E. A.; Jesse, C. R.; Brandao, R.; Nogueira, C. W. Protective effect of caffeine and a selective A2A receptor antagonist on impairment of memory and oxidative stress of aged rats. **Experimental gerontology**, v. 46, n. 4, p. 309-315, 2011.

Lent, R. Cem bilhões de neurônios-Conceitos Fundamentais em Neurociência. 2ª. Edição, Editora Atheneu, 2010.

Liu, Y.; Wong, T. P.; Aarts, M.; Rooyackers, A.; Liu, L.; Lai, T. W.; Wu, D. C.; Lu, J.; Tymianski, M.; Craig, A. M.; Wang, Y, T. NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 11, p. 2846-2857, 2007.

Lommatzsch, M.; Zingler, D.; Schuhbaeck, K.; Schloetcke, K.; Zingler, C.; Schuff-Wermer, P.; Virchow, J. C. The impact of age, weight and gender on BDNF levels in human platelets and plasma. **Neurobiology of aging**, v. 26, n. 1, p. 115-123, 2005.

Mayford, M.; Siegelbaum, S. A.; Kandel, E. R. Synapses and memory storage. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 4, n. 6, p. a005751, 2012.

Mazzatenta, A.; Carluccio, A.; Robbe, D.; Giulio, C. D.; Cellerino, A. The companion dog as a unique translational model for aging. In: **Seminars in cell & developmental biology**, v. 70, p. 141-153, 2017.

Ménard, C.; Quirion, R.; Vigneault, E.; Bouchard, S.; Ferland, G.; El Mestikawy, S.; Gaudreau, P. Glutamate presynaptic vesicular transporter and postsynaptic receptor levels correlate with spatial memory status in aging rat models. **Neurobiology of aging**, v. 36, n. 3, p. 1471-1482, 2015.

Mouro, F. M.; Rombo, D. M.; Dias, R. B.; Ribeiro, J. A.; Sebastião, A. M. Adenosine A2A receptors facilitate synaptic NMDA currents in CA1 pyramidal neurons. **British journal of pharmacology**, v. 175, n. 23, p. 4386-4397, 2018.

Müller, C. E.; Jacobson, K. A. Recent developments in adenosine receptor ligands and their potential as novel drugs. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1808, n. 5, p. 1290-1308, 2011.

Naz, H.; Islam, A.; Ahmad, F.; Hassan, M. I. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV: a multifunctional enzyme and potential therapeutic target. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 121, n. 1, p. 54-65, 2016.

O'Neill, D. G.; Creevy, K. E.; Austad, S. N.; Hoffman, J. M.; Promislow, D. E. Longevity and mortality of owned dogs in England. **The Veterinary Journal**, v. 198, n. 3, p. 638-643, 2013.

Ongini, E.; Fredholm, B. B. Pharmacology of adenosine A2A receptors. **Trends in pharmacological sciences**, v. 17, n. 10, p. 364-372, 1996.

Orr, A. G.; Hsiao, E. C.; Wang, M. M.; Ho, K.; Kim, D. H.; Wang, X.; Guo, W.; Kang, J.; Yu, G. Q.; Adame, A.; Devidze, N.; Dubal, D. B.; Masliah, E.; Conklin, B. R.; Mucke, L. Astrocytic adenosine receptor A2A and G s-coupled signaling regulate memory. **Nature neuroscience**, v. 18, n. 3, p. 423, 2015.

Pagnussat, N.; Almeida, A. S.; Marques, D. M.; Nunes, F.; Chenet, G. C.; Botton, P. H.; Mioranza, S.; Loss, C. M.; Cunha, R. A.; Porciuncula, L. O. Adenosine A2A receptors are necessary and sufficient to trigger memory impairment in adult mice. **British journal of pharmacology**, v. 172, n. 15, p. 3831-3845, 2015.

Panza, F.; Solfrizzi, V.; Barulli, M. R.; Bonfiglio, C.; Guerra, V.; Osella, A.; Seripa, D.; Sabbà, C.; Pilotto, A.; Logroscino, G. Coffee, tea, and caffeine consumption and prevention of late-life cognitive decline and dementia: a systematic review. **The journal of nutrition, health & aging**, v. 19, n. 3, p. 313-328, 2015.

Paoletti, P.; Bellone, C.; Zhou, Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 14, n. 6, p. 383, 2013.

Patronek, G. J.; Waters, D. J.; Glickman, L. T. Comparative longevity of pet dogs and humans: implications for gerontology research. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 52, n. 3, p. B171-B178, 1997.

Pláteník, J.; Fisar, Z.; Buchal, R.; Jirak, R.; Kitzlerova, E.; Zverova, M.; Raboch, J. GSK3 $\beta$ , CREB, and BDNF in peripheral blood of patients with Alzheimer's disease and depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 50, p. 83-93, 2014.

Proctor, D. T.; Coulson, E. J.; Dodd, P. R. Post-synaptic scaffolding protein interactions with glutamate receptors in synaptic dysfunction and Alzheimer's disease. **Progress in neurobiology**, v. 93, n. 4, p. 509-521, 2011.

Ritchie, K. Carrière, I.; de Mendonça, A.; Portet, F.; Dartigues, J. F.; Rouaud, O.; Barberger-Gateau, P.; Ancelin, M. L. The neuroprotective effects of caffeine: a prospective population study (the Three City Study). **Neurology**, v. 69, n. 6, p. 536-545, 2007.

Rofina, J. E.; van Andel, I.; van Ederen, A. M.; Papaioannou, N.; Yamaguchi, H.; Gruys, E. Canine counterpart of senile dementia of the Alzheimer type: amyloid plaques near capillaries but lack of spatial relationship with activated microglia and macrophages. **Amyloid**, v. 10, n. 2, p. 86-96, 2003.

Rofina, J. E.; van Ederen, A. M.; Toussaint, M. J.; Secreve, M.; van der Spek, A.; van der Meer, I.; van Eerdenburd, F. J.; Gruys, E. Cognitive disturbances in old dogs suffering from the canine counterpart of Alzheimer's disease. **Brain research**, v. 1069, n. 1, p. 216-226, 2006.

Romero-Calvo, I.; Ocon, B.; Martinez-Moya, P.; Suarez, M. D.; Zarzuelo, A.; Martinez-Augustin, O.; de Medina, F. S. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. **Analytical biochemistry**, v. 401, n. 2, p. 318-320, 2010.

Schütt, T.; Toft, N.; Berendt, M. Cognitive function, progression of age-related behavioral changes, biomarkers, and survival in dogs more than 8 years old. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 29, n. 6, p. 1569-1577, 2015.

Simonin, C.; Duru, C.; Salleron, J.; Hincker P.; Charles, P.; Delval, A.; Youssov, K.; Burnouf, S.; Azualay, J. P.; Verny, C.; Scherer, C.; Tranchant, C.; Goizet, C.; Debruxelles, S.; Defebvre, L.; Sablonnière, B.; Ramon-Rousseaux, M.; Buée, L.; Destée, A.; Godefroy, O.; Durr, A.; Landwehrmeyer, B. Association between caffeine intake and age at onset in Huntington's disease. **Neurobiology of disease**, v. 58, p. 179-182, 2013.

Surdyk, K. K.; Sloan, D. L.; Brown, S. A. Renal effects of carprofen and etodolac in euvoletic and volume-depleted dogs. **American journal of veterinary research**, v. 73, n. 9, p. 1485-1490, 2012.

Takeda, T. Senescence-accelerated mouse (SAM): a biogerontological resource in aging research. **Neurobiology of aging**, v. 20, n. 2, p. 105-110, 1999.

Tebano, M. T.; Martire, A.; Potenza, R. L.; Gro, C.; Pepponi, R.; Armida, M.; Domenici, M. R.; Schwarzschild, M. A.; Chen, J. F.; Popoli, P. Adenosine A2A receptors are required for normal BDNF levels and BDNF-induced potentiation of synaptic transmission in the mouse hippocampus. **Journal of neurochemistry**, v. 104, n. 1, p. 279-286, 2008.

Teng, H. K.; Teng, K. K.; Lee, R.; Wright, S.; Tevar, S.; Almeida, R. D.; Kermani, P.; Torkin, R.; Chen, Z. Y.; Lee, F. S.; Kraemer, R. T.; Nykjaer, A.; Hempstead, B. L. ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 22, p. 5455-5463, 2005.

Thathiah, A.; de Strooper, B. The role of G protein-coupled receptors in the pathology of Alzheimer's disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 12, n. 2, p. 73, 2011.

Van Deursen, J. M. The role of senescent cells in ageing. **Nature**, v. 509, n. 7501, p. 439, 2014.

Van Galen, P. J.; van Berger, A. H.; Gallo-Rodriguez, C.; Melman, N.; Olah, M. E.; Ijzerman, A. P.; Stiles, G. L.; Jacobson, K. A. A binding site model and structure-activity relationships for the rat A3 adenosine receptor. **Molecular pharmacology**, v. 45, n. 6, p. 1101-1111, 1994.

Veitinger, M.; Varga, B.; Guterres, S.; Zellner, M. Platelets, a reliable source for peripheral Alzheimer's disease biomarkers?. **Acta neuropathologica communications**, v. 2, n. 1, p. 65, 2014.

Vogel-Ciernia, A.; Wood, M. A. Examining object location and object recognition memory in mice. **Current protocols in neuroscience**, v. 69, n. 1, p. 8.31. 1-8.31. 17, 2014.

Wang, G. Zhai, W.; Yang, H. C.; Fan, R. X.; Cao, X.; Zhong, L.; Wang, L.; Liu, F.; Wu, H.; Cheng, L. G.; Poyarkov, A. D.; Poyarkov, N. A.; Tang, S. S.; Zhao, W. M.; Gao, Y.; Lv, X. M.; Irwin, D. M.; Savolainen, P.; Wu, C. I.; Zhang, Y. P. The genomics of selection in dogs and the parallel evolution between dogs and humans. **Nature communications**, v. 4, p. 1860, 2013.

Wei, C. J.; Li, W.; Chen, J-F. Normal and abnormal functions of adenosine receptors in the central nervous system revealed by genetic knockout studies. **Biochimica et biophysica acta (BBA)-biomembranes**, v. 1808, n. 5, p. 1358-1379, 2011.

Youssef, S. A.; Capucchio, M. T.; Rofina, J. E.; Chambers, J. K.; Uchida, K.; Nakayama, H.; Head, E. Pathology of the aging brain in domestic and laboratory animals, and animal models of human neurodegenerative diseases. **Veterinary pathology**, v. 53, n. 2, p. 327-348, 2016.



## APÊNDICES

**APÊNDICE A: Características dos cães utilizados no estudo**

<b>Grupo</b>	<b>Identificação</b>	<b>Idade</b>	<b>Sexo</b>	<b>Raça</b>
Jovens	1	2 anos	Macho	Labrador Retriever
	2	2anos	Fêmea	Sem raça definida
	3	2anos	Macho	Labrador Retriever
	4	2anos	Fêmea	Pitbull Terrier
	5	1anos	Macho	Sem raça definida
	6	1anos	Fêmea	Doberman Pinscher
	7	1anos	Fêmea	Bulldog Inglês
	8	1anos	Fêmea	Bulldog Inglês
	9	1anos	Macho	Labrador Retriever
	10	2anos	Fêmea	Sem raça definida
Velhos	11	15 anos	Fêmea	Labrador Retriever
	12	14 anos	Macho	Labrador Retriever
	13	12 anos	Fêmea	Fila
	14	12 anos	Macho	Basset Hound
	15	13 anos	Fêmea	Pitbull Terrier
	16	12 anos	Macho	Sem raça definida
	17	10 anos	Macho	Sem raça definida
	18	10 anos	Macho	Sem raça definida
	19	10 anos	Fêmea	Bulldog Inglês
	20	10 anos	Macho	Sem raça definida
	21	10 anos	Fêmea	Sem raça definida
	22	17 anos	Macho	Sem raça definida

Fonte: autor.

**APÊNDICE B: Questionário observacional para avaliação comportamental de cães**

<b>Apetite</b>		
<b>1</b>	Normal	1
	Diminuído	2
	Aumentado com diarreia	3
	Aumentado sem diarreia	4
<b>Consumo de água</b>		
<b>2</b>	Normal	1
	Polidipsia	3
<b>Incontinência</b>		
<b>3</b>	Sem incontinência	1
	Urina dentro da casa	2
	Urina e defeca dentro da casa	4
<b>Ritmo diurno/noturno</b>		
<b>4</b>	Normal	1
	Aumento do sono	2
	Dorme durante o dia e não descansa durante a noite	3
<b>Comportamento sem objetivo</b>		
<b>5</b>	Não mostra esse tipo de comportamento	1
	Olhar vago	2
	Caminhar estereotipado	3
	Andar em círculos	4
<b>Atividade/interação</b>		
<b>6</b>	Normal	1
	Diminuído	2
	Sem contato com o ambiente/proprietário	4
<b>Perda da percepção</b>		
<b>7</b>	Sem perda da percepção	1
	Colide contra os móveis	2
	Tenta passar através de espaços estreitos	5
	Tenta passar através do lado errado da porta	5
<b>Desorientação</b>		
<b>8</b>	Sem desorientação	1
	Somente em passeios novos	2
	Em passeios rotineiros	4
	Na própria casa	5
<b>Memória</b>		
<b>9</b>	Normal	1
	Não reconhece a conhecidos habituais	2
	Não reconhece o proprietário depois de um tempo	4
	Não reconhece o proprietário diariamente	5
<b>Mudança de personalidade</b>		
<b>10</b>	Sem alteração	1
	Agressivo para outros animais e criança	2
	Agressivo para o proprietário	4
<b>PONTUAÇÃO TOTAL</b>		